

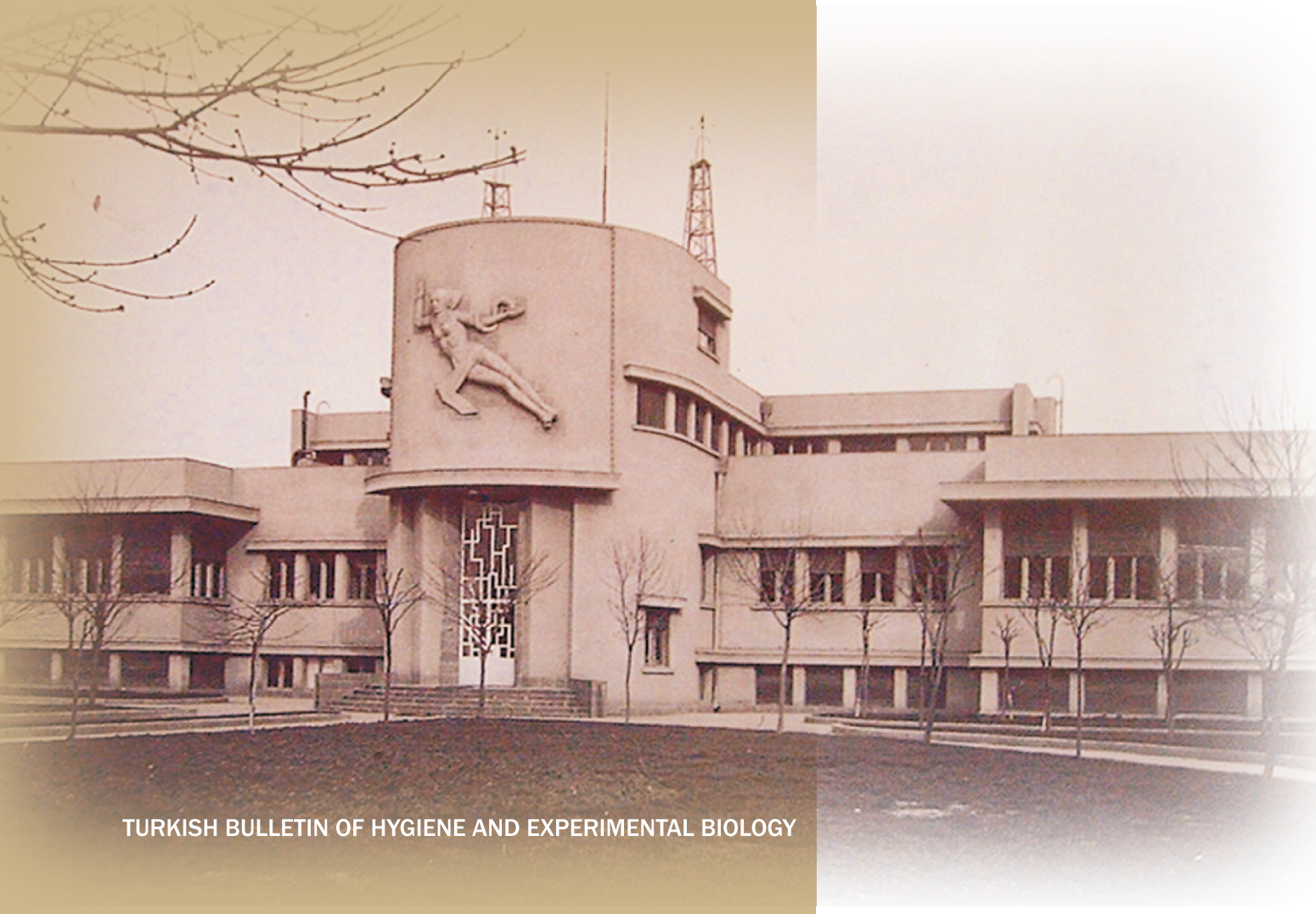


T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 72 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2015





T.C. Sağlık Bakanlığı
Türkiye Halk Sağlığı
Kurumu

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

T.R.
THE MINISTRY OF HEALTH
PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

ISSN 0377-9777 (Basılı / Printed)

ISSN 1308-2523 (Çevrimiçi / Online)

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

■ Cilt/Vol 72 ■ Sayı/Number 3 ■ Yıl/Year 2015

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND
EXPERIMENTAL BIOLOGY

Turk Hij Den Biyol Derg



TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Sahibi / Owner

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu adına
On behalf Public Health Institution of Turkey

İrfan ŞENCAN, Başkan (President)

EDİTÖR / EDITOR IN CHIEF

Hasan IRMAK

EDİTÖR YARDIMCILARI / DEPUTY EDITORS

Yavuz UYAR

Ayşegül TAYLAN-ÖZKAN

Demet CANSARAN-DUMAN

Nurhan ALBAYRAK

Pınar KAYNAR

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Fatih BAKIR

Mehmet Kürşat DERİCİ

Mestan EMEK

Şule ŞENSES-ERGÜL

Arsun ESMER

Sibel KARACA

Selin NAR-ÖTGÜN

Dilek YAĞCI-ÇAĞLAYIK

Dilek DİKMEN

Gülsen TOPAKTAŞ

Sinan BULUT

TEKNİK KURUL / TECHNICAL BOARD

Ahmet Murad BAYRAM

Murat DUMAN

Zeynep KÖSEOĞLU

Selahattin TAŞOĞLU

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU

PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY
ANKARA-TÜRKİYE

Yılda dört kez yayınlanır / Published four times per year
Asitsiz kağıt kullanılmıştır / Acid free paper is used

Tasarım - Dizgi / Design - Editing :

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu / Public Health Institution of Turkey
Destek Hizmetleri / Supportive Services
Satınalma ve İdari İşler Daire Başkanlığı /
Purchasing and Administrative Affairs Department

Baskı ve Cilt / Press and Binding :

Koza Basım~Yayın
Özveren Sok. No: 13/A Kızılay-Ankara
Tel: +90 312 229 37 41-42
e-posta: anilgroupkoza@hotmail.com

Yayın Türü / Type of Publication :

Yerel Süreli Yayın / Periodical Publication

Basım Tarihi / Date of Publication :

2015

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSLARARASI BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / INTERNATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Ali MIRAZIMI, Sweden

Anna PAPA, Greece

Aziz SANCAR, USA

Cristina DOMINGO, Germany

Daniel MOTLHANKA, Botswana

Dwight D. BOWMAN, USA

Isme HUMOLLI, Kosovo

Isuf DEDUSHAJ, Kosovo

Iva CHRISTOVA, Bulgaria

Johan LINDH, Sweden

Kosta Y. MUMCUOĞLU, Israel

Manfred WEIDMANN, U.Kingdom

Paul HEYMAN, Belgium

Pauline MWINZI, Kenya

Roberto Caneta VILLAFRANCE, Cuba

Sıraç DİLBER, Sweden

Susana RODRIGUEZ-COUTO, Spain

Takashi AKAMATSU, Japan

Varalakshmi ELANGO, India

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

A. Gülçin SAĞDIÇOĞLU-ÇELEP, Ankara

Ahmet ÇARHAN, Ankara

Ahmet KART, Ankara

Akçahan GEPDİREMEN, Bolu

Ali ALBAY, Ankara

Ali Kudret ADİLOĞLU, Ankara

Ali Naci YILDIZ, Ankara

Alp ERGÖR, İzmir

Alper AKÇALI, Çanakkale

Arsun ESMER, Ankara

Aşkın YAŞAR, Ankara

Ateş KARA, Ankara

Aydan ÖZKÜTÜK, İzmir

Ayhan FİLAZİ, Ankara

Aykut ÖZKUL, Ankara

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Çorum

Banu ÇAKIR, Ankara

Bekir ÇELEBİ, Ankara

Belgin ÜNAL, İzmir

Berrin ESEN, Ankara

Birce TABAN, Ankara

Bülent ALTEN, Ankara

Celal F. GÖKÇAY, Ankara

Cemal SAYDAM, Ankara

Çağatay GÜLER, Ankara

Delia Teresa SPONZA, İzmir

Demet CANSARAN DUMAN, Ankara

Dilek ASLAN, Ankara

Dilek DİKMEN, Ankara

Dilek YAĞCI ÇAĞLAYIK, Ankara

Diler ASLAN, Denizli

Doğan YÜCEL, Ankara

Duygu ÖZEL DEMİRALP, Ankara

Duygu TUNCER, Ankara

Dürdal US, Ankara

Ender YARSAN, Ankara

Erhan ESER, Manisa

Erkan YILMAZ, Ankara

Fatih BAKIR, Ankara

Fatih KÖKSAL, Adana

Fügen DURLU ÖZKAYA, Ankara

Fügen YÖRÜK, Ankara

Gönül ŞAHİN, Ankara

Görkem MERGEN, Ankara

Gül ERGÖR, İzmir

Gül Ruhsar YILMAZ, Ankara

TÜRK HİJYEN ve DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

ULUSAL BİLİMSEL DANIŞMA KURULU / NATIONAL SCIENTIFIC ADVISORY BOARD

Gülberk UÇAR, Ankara	Orhan YILMAZ, Ankara
Gülnur TARHAN, Adıyaman	Ömer Faruk TEKBAŞ, Ankara
Gülşen TOPAKTAŞ, Ankara	Özlem KURT AZAP, Ankara
Hakan ABACIOĞLU, İzmir	Pınar KAYNAR, Ankara
Hakan LEBLEBİCİOĞLU, Samsun	Pınar OKYAY, Aydın
Haluk VAHABOĞLU, İstanbul	Rahmet GÜNER, Ankara
Hasan TEZER, Ankara	Recep AKDUR, Ankara
Hilal ÖZDAĞ, Ankara	Recep KEŞLİ, Afyon
Hürrem BODUR, Ankara	Recep ÖZTÜRK, İstanbul
Işıl MARAL, İstanbul	Rıza DURMAZ, Ankara
İ.Mehmet Ali ÖKTEM, İzmir	S. Aykut AYTAÇ, Ankara
İrfan EROL, Ankara	Sami AYDOĞAN, Kayseri
İrfan ŞENCAN, Ankara	Seçil ÖZKAN, Ankara
İsmail CEYHAN, Ankara	Seda KARASU YALÇIN, Bolu
Kemal Osman MEMİKOĞLU, Ankara	Seda TEZCAN, Mersin
Koray ERGÜNAY, Ankara	Selçuk KAYA, Trabzon
Levent AKIN, Ankara	Selçuk KILIÇ, Ankara
Mahinur AKKAYA, Ankara	Selim KILIÇ, Ankara
Mehmet Ali ONUR, Ankara	Selin NAR ÖTGÜN, Ankara
Mehmet Kürşat DERİCİ, Ankara	Sema BURGAZ, Ankara
Mestan EMEK, İzmir	Sercan ULUSOY, İzmir
Metin KORKMAZ, İzmir	Sibel KARACA, Ankara
Mithat ŞAHİN, Kars	Sinan BULUT, Ankara
Muhsin AKBABA, Adana	Sultan ESER, İzmir
Murat DİZBAY, Ankara	Suzan ÖZTÜRK YILMAZ, Sakarya
Murat GÜNAYDIN, İstanbul	Süheyla SÜRÜCÜOĞLU, Manisa
Murat HÖKELEK, İstanbul	Sümer ARAS, Ankara
Mustafa KAVUTÇU, Ankara	Şule SENSES ERGÜL, Ankara
Mutlu ÇELİK, Kocaeli	Tevfik PINAR, Kırıkkale
Mükerrem KAYA, Erzurum	Yavuz UYAR, İstanbul
Nazmi ÖZER, Ankara	Yeşim ÇETİNKAYA ŞARDAN, Ankara
Nilay ÇÖPLÜ, Ankara	Yeşim ÖZBAŞ, Ankara
Nur AKSAKAL, Ankara	Yeşim TUNÇOK, İzmir
Nur Münevver PINAR, Ankara	Zafer ECEVİT, Ankara
Nuran ESEN, İzmir	Zafer KARAER, Ankara
Nurhan ALBAYRAK, Ankara	Zati VATANSEVER, Kars
Nuri KİRAZ, İstanbul	Zehranur YÜKSEKDAĞ, Ankara
Oğuz GÜRSOY, Denizli	Zeynep GÜLAY, İzmir
Orhan BAYLAN, İstanbul	

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ YAZIM KURALLARI

Dergide yayımlanmak üzere gönderilen yazılar, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi yazım kurallarına göre hazırlanmalıdır. Başvurular www.turkhijyen.org adresinden “Çevrimiçi Makale Gönder, Takip Et, Değerlendir Programı” aracılığıyla on line olarak yapılabilir.

Gönderilen yazılarda aşağıdaki kurallara uyum aranır. Kurallara uymayan yazılar daha ileri bir incelemeye gerek görülmezsiniz yazarlarına iade edilir.

1. “Telif Hakkı Devir Formu” tüm yazarlarca imzalanarak onaylandıktan sonra dergimizin makale kabul sistemine yüklenmelidir.

2. Makale başlığı, İngilizce başlık, kısa başlık, yazar adları, çatışılan kurumlara ait birimler, yazışma işini üstleneni yazının açık adresi, telefon numaraları (sabit ve cep), elektronik posta adresi belirtilmelidir:

- Yazının başlığı kısa olmalı ve küçük harfle yazılmalıdır.
- Sayfa başlarına konan kısa başlık 40 karakteri geçmemelidir.
- Çalışma bilimsel bir kuruluş ve/veya fon ile desteklenmişse dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

d. Makale, kongre/sempozyumda sunulmuşsa sunum türü ile birlikte dipnot veya teşekkür bölümünde mutlaka belirtilmelidir.

3. Yazılardaki terimler mümkün olduğunca Türkçe ve Latince olmalı, dilimize yerleşmiş kelimelere yer verilmeli ve Türk Dil Kurumu'nun güncel sözlüğü kullanılmalıdır. Öz Türkçe'ye özen gösterilmeli ve Türkçe kaynak kullanımına önem verilmelidir.

4. Metin içinde geçen mikroorganizma isimleri ilk kullanıldığında tam ve açık yazılmalı, daha sonraki kullanımlarda kısaltılarak verilmelidir. Mikroorganizmaların orijinal Latince isimleri italik yazılmalıdır: Örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* gibi. Yazıda sadece cins adı geçen cümlelerde stafilokok, streptokok gibi dilimize yerleşmiş cins adları Türkçe olarak yazılabilir. Antibiyotik isimleri dil bütünlüğü açısından okunduğu gibi yazılmalı; uluslararası standartlara uygun olarak kısaltılmamalıdır.

5. Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri Uluslararası Birimler Sistemi (SI)'ne göre verilmelidir.

6. Yazılar bir zorunluluk olmadıkça “geçmiş zaman edilgen” kip ile yazılmalıdır.

7. Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıklı yazılmalı ve sayfa kenarlarından 2,5 cm boşluk bırakılmamalıdır.

8. Yazarlar araştırma ve yayın etiğine uymalıdır. Klinik araştırmalarda, çalışmaya katılanlardan bilgilendirilmiş olur alındığının gereği ve yöntem bölümünde belirtilmesi gerekmektedir. Gönüllü ya da hastalara uygulanacak prosedürlerin özelliği tümüyle anlatıldıktan sonra, kendilerinin bilgilendirilip onaylarının alındığını gösterir bir cümle bulunmalıdır. Yazarlar Helsinki Bildirgesi'nde ana hatları çizilen ilkeleri izlemelidir. Yazarlar, bu tür bir çalışmada söz konusu olduğunda, uluslararası alanda kabul edilen kılavuzlara ve yürürlükte olan tüm mevzuatta belirtilen hükümlere uymalı ve “Etik Kurul Onayı”nı göndermelidir.

9. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar için de gereken izinler alınmalı; yazıda deneklere ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için neler yapıldığı açık bir şekilde belirtilmelidir.

10. Hasta kimliğini tanıttak fotoğraf kullanıldığında, hastanın yazılı onayı gönderilmelidir.

11. Araştırma yazıları;

Türkçe Özet, İngilizce Özet, Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular, Tartışma, Teşekkür (varsa) ve Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır. Bu bölüm başlıkları sola yaslanacak şekilde büyük harflerle kalın yazılmalıdır. İngilizce makalelerde de Türkçe başlık, kısa başlık ve özet bulunmalıdır.

a) **Türkçe Özet:** Amaç, Yöntem, Bulgular ve Sonuç, alt başlıklarından oluşmalıdır (yapılandırılmış özet) ve en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir.

b) **İngilizce Özet (Abstract):** Türkçe Özet bölümünde belirtilenleri birebir karşılayacak şekilde “Objective, Method, Results, Conclusion” olarak yapılandırılmalıdır.

c) **Anahtar Kelimeler:** 3-8 arasında olmalı ve Index Medicus Medical Subject Headings-(MeSH)'de yer alan kelimeler kullanılmalıdır. Türkçe anahtar kelimelerinizi oluşturmak için <http://www.bilimterimleri.com/> adresini kullanınız.

d) **Giriş:** Araştırmanın amacı ve gerekçesi güncel literatür bilgisi ile desteklenerek iki sayfayı aşmayacak şekilde sunulmalıdır.

e) **Gereç ve Yöntem:** Araştırmanın gerçekleştirildiği kurum/kuruluş ve tarih belirtilmeli, araştırmada kullanılan araç, gereç ve yöntem sunulmalı; istatistiksel yöntemler açıkça belirtilmelidir.

f) **Bulgular:** Sadece araştırmada elde edilen bulgular belirtilmelidir.

g) **Tartışma:** Araştırmanın sonunda elde edilen bulgular, diğer araştırmacıların bulgularıyla karşılaştırılmalıdır. Araştırmacı, kendi yorumlarını bu bölümde aktarmalıdır.

h) **Teşekkür:** Ana metnin sonunda kaynaklardan hemen önce yer almalıdır. Teşekkür bölümünde çalışmaya destek veren kişi, kurum/kuruluşlar yer almalıdır.

i) **Kaynaklar:** Yazarlar kaynakların eksiksiz ve doğru yazılmasından sorumludur. Kaynaklar, metnin içinde geçiş sırasına göre numaralandırılmamalıdır. Numaralar, parantez içinde cümle sonlarında verilmelidir. Kaynakların yazılımlı ile ilgili aşağıda örnekler verilmiştir. Daha detaylı bilgi için “Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals” (J Am Med Assoc 1997; 277: 927-934) (<http://www.nejm.org/>) bakılmamalıdır.

Süreli yayın: Yazar(lar)ın Soyadı Adının baş harf(ler)i (altı veya daha az yazar varsa hepsi yazılmalıdır; yazar sayısı yedi veya daha çoksa yalnız ilk altısını yazıp “et al.” veya “ve ark.” eklenmelidir). Makalenin başlığı, Derginin Index Medicus'a uygun kısaltılmış ismi, Yıl; Cilt (Sayı): İlk ve son sayfa numarası.

• Standart dergi makalesi için örnek: Demirci M, Ünlü M, Şahin Ü. A case of hydatid lung cyst diagnosed by kinyoun staining of bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitol Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.

• Yazarı verilmemiş makale için örnek: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283: 628.

• Dergi eki için örnek: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

Kitap: Yazar(lar)ın soyadı adının baş harf(ler)i. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı.

• Örnek: Eisen HN. Immunology: an Introduction to Molecular and Cellular Principles of the Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Kitap bölümü: Bölüm yazar(lar)ın soyadı adının başharf(ler)i. Bölüm başlığı. In: Editör(ler)in soyadı adının başharf(ler)i ed/eds. Kitabın adı. Kaçınıcı baskı olduğu. Basım yeri: Yayınevi, Basım yılı: Bölümün ilk ve son sayfa numarası.

• Örnek: Weinstein L, Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. Pathologic Physiology: Mechanism of Disease. Philadelphia. WB Saunders, 1974: 457-72.

Web adresi: Eğer doğrudan “web” adresi referans olarak kullanılacaksa adres ile birlikte parantez içinde bilgiye ulaşılan tarih de belirtilmelidir. Web erişimli makalelerin referans olarak metin içinde verilmesi gerektiğinde DOI (Digital Object Identifier) numarası verilmesi şarttır.

Kongre bildirisi: Entrala E, Mascaró C. New structural findings in Cryptosporidium parvum oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey. 1994.

Tez: Bilhan Ö. Labirent savakların hidrolik karakteristiklerinin deneysel olarak incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2005.

GenBank/DNA dizisi analizi: Gen kalıtım numaraları ve DNA dizileri makale içinde kaynak olarak gösterilmelidir. Konuyla ilgili ayrıntılı bilgi için “National Library of Medicine” adresinde “National Center for Biotechnical Information (NCBI)” bölümüne bakınız.

Şekil ve Tablolar: Her tablo veya şekil ayrı bir sayfaya basılmalı, alt ve üst çizgiler ve gerektiğinde ara sütun çizgileri içermelidir. Tablolar, “Tablo 1.” şeklinde numaralandırılmalı ve tablo başlığı tablo üst çizgisinin üstüne yazılmalıdır. Açıklayıcı bilgiye başlıkta değil dipnota yer verilmeli, uygun simgeler (*,+,,+, v.b.) kullanılmalıdır. Fotoğraflar “jpeg” formatında ve en az 300 dpi olmalıdır. Baskı kalitesinin artırılması için gerekli olduğu durumlarda fotoğrafların orijinal halleri talep edilebilir.

12. Araştırma Makalesi türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 40 olmalıdır.

13. Derleme türü yazılarda tercih edilen yazar sayısı ikiden fazla olmamalıdır. Yazar(lar) daha önce bu konuda çalışma ve yayın yapmış olmalı; bu deneyimlerini derleme yazısında tartışmalı ve kaynak olarak göstermelidir. Derlemelerde Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet (en az 250, en fazla 400 kelime içermelidir) ve anahtar kelimeler bulunmalıdır. Derleme türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 60 olmalıdır.

14. Olgu sunularında metin yedi sayfayı aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce olarak başlık, özet ve anahtar kelimeler ayrıca giriş, olgu ve tartışma bölümleri bulunmalıdır. Olgu sunumu türü yazılar için kaynak sayısı en fazla 20 olmalıdır.

15. Editöre Mektup: Daha önce yayımlanmış yazılara eleştiri getirmek, katkıda bulunmak ya da bilim haberi niteliği taşıyacak bilgilerin iletilmesi amacıyla yazılan yazılar, Yayın Kurulu'nun inceleme ve değerlendirilmesinin ardından yayınlanır. Editöre Mektup bir sayfayı aşmamalı ve kaynak sayısı en fazla 10 olmalıdır.

16. Bu kurallara uygun olmayan metinler kabul edilmez.

17. Yazarlar teslim ettikleri yazının bir kopyasını saklamalıdır.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu

Tel : (0312) 565 55 79

Faks : (0312) 565 54 55

e-posta : turkhijyen@thsk.gov.tr

WRITING RULES OF TURKISH BULLETIN OF HYGIENE AND EXPERIMENTAL BIOLOGY

Articles should be prepared according to the rules of the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Submissions can be made online at the address www.turkhijyen.org through the Online "Manuscript Submission, Tracking, Evaluation Program".

Manuscripts are checked according to the following rules. If the rules are not adhered to, manuscripts will be returned to the author.

1. The "Copyright Transfer Form" (Copyright Release Form) after being signed by all authors should be uploaded using the article accepting system of the journal.

2. The title of article, short title, author name(s), names of institutions and the departments of the authors, full address, telephone numbers (landline and mobile) and e-mail address should be given:

- The title should be short and written in lower case.
- The short title should not exceed 40 characters.
- The study supported by a fund or scientific organisation must be mentioned in a footnote or in the acknowledgements.
- The study presented in a conference/symposium must be mentioned with the type of presentation in footnotes or in the acknowledgements.

3. For Turkish studies; Terms used in articles should be in Turkish and Latin as much as possible, according to the latest dictionary of the "Turkish Language Institution". Importance should be given to use pure Turkish language and as many as Turkish references.

4. Latin names of microorganisms used for the first time in the text have to be written in full. If these names are used later, they should be abbreviated in accordance to international rules. The original Latin names of microorganisms should be written in *italic*: for example, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*. Names of antibiotics should be abbreviated in accordance with international standards.

5. Symbols of the units mentioned in the text should be according to "The Système International (SI)".

6. Articles should be written in one of the "past perfect, present perfect and past" tenses and in the passive mode.

7. Only one side of A4 paper should be used and should have a 2.5 cm margin on each side. 12 pt, Times New Roman font and double line space should be used.

8. The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology expects the authors to comply with the ethics of research and publication. In human research, a statement of the informed consent of those who participated in the study is needed in the section of the "Materials and Methods". In case of procedures that will apply to volunteers or patients, it should be stated that the study objects have been informed and given their approval before the study started. In case the authors do not have a local ethics committee, the principles outlined in the "Declaration of Helsinki" should have been followed. Authors should declare that they have followed the internationally accepted latest guidelines, legislation and other related regulations and should send "Approval of the Ethics Committee".

9. In case animal studies, approval also is needed; it should be stated clearly that the subjects will be prevented as much as possible from pain, suffering and inconvenience.

10. In case patient photos are used which shows his/her ID, a written informed consent of the patient on the use of the photos must be submitted.

11. Research Articles;

Research papers should consist of Turkish abstract, English abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (if any), and References sections. These sections should be written in bold capital letters and aligned left. English articles should have a Turkish abstract and title in Turkish. (If the all of the authors from abroad the manuscript and abstract can be write English language).

a) Turkish Abstract should consist of the subheadings of Objective, Methods, Results and Conclusion (Structured Abstract). It should be between 250 and 400 words.

b) **English Abstract:** The abstract should be structured like the Turkish abstract (Objective, Methods, Results, and Conclusion). It should be between 250 and 400 words.

c) **Key words** The number of keywords should be between 3-8 and the terminology of the Medical Subjects Headings (Index Medicus Medical Subject Headings-MeSH) should be used.

d) **Introduction:** The aim of the study, and references given to similar studies should be presented briefly and should not exceed more than two pages.

e) **Materials and Methods:** The date of the study, institution that performed the study, and materials and methods should be clearly presented. Statistical methods should be clearly stated.

f) **Results:** The results should be stated clearly and only include the current research.

g) **Conclusions:** In this section, the study findings should be compared with the findings of other researchers. Authors should mention their comments in this section.

h) **Acknowledgements** should be placed at the end of the main text and before the references. In this section, the institutions/departments which supported the research should be stated.

i) **References:** Authors are responsible for supply complete and correct references. References should be numbered according to the order used in the text.

Numbers should be given in brackets and placed at the end of the sentence. Examples are given below on the use of references. Detailed information can be found in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (J Am Med Assoc 1997 277: 927-934) and at <http://www.nejm.org/general/text/requirements/1.htm>.

Periodicals: Author(s) Last Name initial(s) name of author(s) (if there are six or fewer authors, all authors should be written; if the number of authors are seven or more, only the first six of the authors should be written and the rest as "et al"). The title of the article, the abbreviated name of the journal according to the Index Medicus, Year; Volume (Issue): The first and last page numbers.

- Example of standard journal article: Demirci M, Unlü M, Sahin U. A case of hydatid cyst diagnosed by kinyoun staining of lung bronco-alveolar fluid. *Türkiye Parazitol Derg*, 2001; 25 (3): 234-5.
- Example of an article with authors unknown: Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas (Editorial). *Br Med J*, 1981; 283:628.
- Example of journal supplement: Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: Demonstration of splenic activity by bone marrow scan (Abstract). *Blood*, 1979; 54 (Suppl 1): 26a.

Books: Surname of the author(s) initial name(s) of author(s). The name of the book. The edition number. Place of publication: Publisher, Publication year. **Example:** Eisen HN. Immunology: an Introduction to the Principles of Molecular and Cellular Immune Response. 5th ed. New York: Harper and Row, 1974.

Book chapters: The author(s) surname of the chapter initial(s) letter of the name. Section title. In: Surname of editor(s) initial (s) letter of first name(s) ed / eds. The name of the book. Edition number. Place of publication: Publisher, year of publication: The first and last page numbers of the chapter.

- Example: Weinstein L. Swarts MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic Physiology: Mechanism of Disease*. Philadelphia. WB Saunders, 1974:457-72.

Web address: If a "web" address is used as the reference address, the web address date should be given in brackets with the address. The DOI (Digital Object Identifier) number must be provided, when a web access article used in the text as a reference.

Congress papers: Entrala E, Mascaro C. New structural findings in *Cryptosporidium parvum* oocysts. Eighth International Congress of Parasitology (ICOPA VIII). October, 10-14, Izmir-Turkey. 1994.

Thesis: Bilhan Ö. Experimental investigation of the hydraulic characteristics of labyrinth weir. Master Thesis, Science Institute of Firat University, 2005.

GenBank / DNA sequence analysis: DNA sequences of genes and heredity numbers should be given as references in the article. For more information, check "National Library of Medicine" and "National Center for Biotechnical Information (NCBI)".

Figure and Tables: Each table or figure should be printed on a separate sheet, the top and bottom lines and if necessary column lines must be included.

Tables should be numbered like "Table 1." and the table title should be written above the top line of the table. Explanatory information should be given in footnotes, not in the title and appropriate icons (*, +, ++, etc.) should be used.

Photos should be in "jpeg" format. In case the quality of the photos is not good for publication, the originals can be requested.

12. Research articles should have up to 40 references.

13. In reviews, it is preferred to have not more than two authors. Author(s) must have done research and published articles previously on this subject; they should discuss their experience and use as reference in the review. Reviews should have Turkish and English titles, abstracts (it should contain minimum 250, maximum 400 words) and key words. Reference numbers for the review should be maximum 60.

14. Case reports should have a maximum of seven pages of text.

Case report should have a Turkish and English title, abstract, keyword(s) and also introduction, case description and discussion sections should be given. Number of references should be maximum 20.

15. Letters to Editor: Written to make criticisms, additions to previously published articles or scientific updates are published after review and assessment of the Editorial Board. Letters should not exceed one page of text and must be supported with up to 10 references.

16. The articles which do not comply with the journal rules are not accepted.

17. Authors should keep a copy of the article that they submit.

Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Public Health Institution of Turkey

Tel : +90 312 565 55 79

Fax : +90 312 565 54 55

e-mail : turkhijyen@thsk.gov.tr

TÜRK HİJYEN VE DENEYSEL BİYOLOJİ DERGİSİ

YAYIN İLKELERİ

- Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu yayın organıdır. Dergi üç (3) ayda bir çıkar ve dört (4) sayıda bir cilt tamamlanır.
- Dergide biyoloji, mikrobiyoloji, enfeksiyon hastalıkları, farmakoloji, toksikoloji, immünoloji, parazitoloji, entomoloji, kimya, biyokimya, gıda, beslenme, çevre, halk sağlığı, epidemiyoloji, patoloji, fizyopatoloji, moleküler biyoloji, genetik, biyoteknoloji ile ilgili alanlardaki özgün araştırma, olgu sunumu, derleme, editöre mektup türündeki yazılar Türkçe ve İngilizce olarak yayımlanır.
- Dergiye, daha önce başka yerde yayımlanmamış ve yayımlanmak üzere başka bir dergide inceleme aşamasında olmayan yazılar kabul edilir.
- Dergi Yayın Kurulu tarafından uygun görülen yazılar, konu ile ilgili en az iki Bilimsel Danışma Kurulu Üyesinden olumlu görüş alındığında yayımlanmaya hak kazanır. Bu kurulların, yazının içeriğini değiştirmeyen her türlü düzeltme ve kısaltmaları yapma yetkileri vardır.
- Yazıların bilimsel ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.
- Yazarlar araştırma ve yayın etiğine tam olarak uyum göstermelidir.
- Dergide yayımlanan yazıların yayın hakkı Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne aittir. Yazarlara telif ücreti ödenmez.

YAZAR(LAR) İÇİN MAKALE KONTROL LİSTESİ

- Bütün yazarlarca isim sırasına göre imzalanmış telif hakkı devir formu eksiksiz olarak dolduruldu.
 - Yazar isimleri açık olarak yazıldı.
 - Her yazarın bağlı bulunduğu kurum adı, yazar adının yanına numara verilerek başlık sayfasında belirtildi.
 - Yazışmalardan sorumlu yazarın adı, adresi, telefon-faks numaraları ve e-posta adresi verildi.
 - Türkçe ve İngilizce başlıklar ile kısa başlık yazıldı.
 - Türkçe ve İngilizce özetlerin kelime sayısı (300-500 arası) kontrol edildi.
 - Türkçe ve İngilizce anahtar kelimeler (MeSH ve Türk Tıp Terimleri Sözlüğü'ne uygun) verildi.
 - Tüm kısaltmalar gözden geçirildi ve standart olmayan kısaltmalar düzeltildi.
 - Metin içerisinde geçen orijinal Latince mikroorganizma isimleri italik olarak yazıldı.
 - Metin içerisinde bahsedilen birimlerin sembolleri the Système International (SI)'e göre verildi.
 - Yazılar "miş'li geçmiş" zaman edilgen kip ile yazıldı.
 - Metnin tamamı 12 punto Times New Roman karakteri ile çift aralıkla yazıldı.
 - Metin sayfanın yalnız bir yüzüne yazılarak her bir kenardan 2,5 cm boşluk bırakıldı.
 - Tablolar, şekiller yazım kurallarına uygun olarak ve her biri ayrı bir sayfada verildi.
 - Fotoğraflar JPEG formatında aktarıldı.
 - Kaynaklar cümle sonlarında parantez içinde ve metin içinde kullanım sırasına göre ardışık sıralandı.
 - Kaynaklar, makale sonunda metin içinde verildiği sırada listelendi.
 - Kaynaklar gözden geçirildi ve tüm yazar adları, ifade ve noktalamalar yazım kurallarına uygun hale getirildi.
- Ayrıca aşağıda belirtilen maddeleri dikkate alınız.
- Etik kurul onayı alındı.
 - Bilimsel kuruluş ve/veya fon desteği belirtildi.
 - Kongre/Sempozyumda sunumu ve sunum türü belirtildi.
 - Varsa teşekkür bölümü oluşturuldu.

EDITORIAL POLICY

- The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology is a publication of the “Public Health Institute of Turkey (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu)” of Ministry of Health. The Journal is published every three months and one volume consists of four issues.
- The journal publishes biology, microbiology, infectious diseases, pharmacology, toxicology, immunology, parasitology, entomology, chemistry, biochemistry, food safety, environmental, health, public health, epidemiology, pathology, pathophysiology, molecular biology, genetics, biotechnology in the field of original research, case report, reviews and letters to the editor are published in Turkish and English.
- Articles which are not previously published in another journal or not currently under evaluation elsewhere can be accepted for the journal.
- Articles approved by the Scientific Committee and Editorial Board are eligible to be released after receiving at least two positive opinions from the Scientific Committee members. Those committees have the authority to make all corrections and abbreviations but not to change the content of the article.
- The authors have the all the scientific and legal responsibilities of the articles.
- The authors must fully obey the ethics of research and publication.
- The copyright of the article published in the Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology belongs to the Journal. Copyright fee is not paid to the authors.

CHECKLIST OF THE ARTICLE FOR AUTHOR(S)

- Copyright transfer form is completed in full and signed by all authors according to the name order.
 - Author names are written clearly.
 - Affiliated institutions of the all authors are given on the title page by the number stated after the author's name.
 - The name, address, phone-fax numbers and mail address of the author responsible for correspondence are given.
 - Turkish, English titles and short title are written.
 - The number of words in Turkish and English abstracts (between 300-500) is checked.
 - Turkish and English keywords (according to MeSH) are given.
 - All abbreviations are reviewed and non-standard abbreviations are corrected
 - Original Latin names of microorganisms are written in italic.
 - Symbols are mentioned according to the units in the Système International (SI).
 - The article is written in passive mode and given one of the “past perfect, present perfect or past ” tenses.
 - Text is written in 12 pt Times New Roman characters and with double line spacing.
 - Text is written only on one side of the page and has 2.5 cm space at each side.
 - Tables and figures are given on each separate page according to the writing rules.
 - Photos are in JPEG format.
 - References are given at the end of the sentence in brackets and are listed in order of use in the text.
 - References are listed at the end of the article in the order given in the text.
 - References are reviewed, and the name of all authors, spelling and punctuation are controlled according the writing rules.
- Furthermore, please check.**
- “Ethics Committee Approval” is given.
 - Support to a study by a fund or organization is mentioned.
 - Congress / Symposium presentations and the type of presentation are stated.
 - Acknowledgement is given, if there is.

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne
www.turkhijyen.org adresinden online olarak makale gönderilebilir.

Submissions can be made online at the address www.turkhijyen.org
to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.



DOAJ DIRECTORY OF
OPEN ACCESS
JOURNALS



INDEX COPERNICUS
INTERNATIONAL



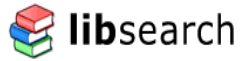
SCIRUS
for scientific information only

Academic Journals Database
disseminating
quality controlled scientific knowledge



Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi (Türk Hij Den Biyol Derg); CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Diagnosis of Human Diseases, Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts, Food Contamination, Residues and Toxicology, Human Toxicology and Poisoning), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, Ovid Link Solver, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Libsearch, Medoanet, SCOPUS, CrossRef, Türkiye Atıf Dizini, Akademik Türk Dergileri İndeksi, Türk - Medline ve TUBİTAK-ULAKBİM Türk Tıp Dizini'nde dizinlenmektedir.

The Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology (Türk Hij Den Biyol Derg) is indexed in CAB Abstracts (Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, Diagnosis of Human Diseases, Tropical Diseases Bulletin, Global Health, AgBiotech, Veterinary Abstracts, Food Contamination, Residues and Toxicology, Human Toxicology and Poisoning), DOAJ (Directory of Open Access Journals), Index Copernicus, CAS (Chemical Abstracts Service), Google Scholar, Google, Open J-Gate, Ulrichsweb and Serials Solutions, NewJour, Genamics JournalSeek, Academic Journals Database, Scirus Scientific Database, Ovid Link Solver, BASE (Bielefeld Academic Search Engine), EBSCOhost Electronic Journals Service (EJS), Libsearch, Medoanet, SCOPUS, CrossRef, Türkiye Atıf Dizini, Turkish Academic Journals Index, Türk - Medline, and TUBİTAK-ULAKBİM Türk Tıp Dizini.



İLETİŞİM

CORRESPONDENCE

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu
Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi

Public Health Institution of Turkey
Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mahallesi Adnan Saygun Caddesi No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye/ANKARA - TÜRKİYE

Tel: 0312 565 55 79

Faks: 0312 565 54 55

e-posta: turkhijyen@thsk.gov.tr

<http://www.thsk.gov.tr>

www.turkhijyen.org

■ Araştırma Makalesi / Original Article

1. Türkiye’de mikrobiyoloji laboratuvarlarının kültür ve antibiyotik duyarlılık testi performans değerlendirmesi ve Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemine veri sağlayacak laboratuvarların seçimi: Anket uygulaması
Performance evaluation of the microbiology laboratories in Turkey for culture and antibiotic susceptibility tests and the selection of laboratories to provide data for National Antimicrobial Resistance Surveillance System: Questionnaire application
Ayşegül GÖZALAN, Nilay ÇÖPLÜ, Dilber AKTAŞ, Hüsnüye ŞİMŞEK, Gül Bahar ERDEM, İpek MUMCUOĞLU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.30306 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 175 - 182 
2. Hastanede yatan ishallerli hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi
Investigation of *Clostridium difficile* toxin in stool samples of patients hospitalized for diarrhea and analysis of the risk factors
Hande KOSTUL, Nuran DELİALİOĞLU, Elif ŞAHİN-HORASAN, Gürol EMEKDAŞ, Candan ÖZTÜRK, Necdet KUYUCU
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.36024 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 183 - 190 
3. Mardin Devlet Hastanesi’nde 2011-2013 yılları arasında metisiline dirençli stafilocoklarda direnç profilleri
Resistance patterns of the methicillin resistant staphylococci between 2011 and 2013 in Mardin State Hospital
Filiz ORAK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.78309 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 191 - 198 
4. Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi
Determination of microbiological characteristics of several kinds of ready-to-eat meals presented for consumption
Şule ŞENSES-ERGÜL, Havva SARI, Sevinç ERTAŞ, Umut BERBEROĞLU, Yıldırım CESARETLİ, Hasan IRMAK
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.81994 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 199 - 208 
5. Manisa’da aynı yemek şirketinden yemek alan farklı işletmelerde meydana gelen stafilocok kaynaklı besin zehirlenmesi
Food poisoning caused by staphylococcus in various workplaces getting food from the same catering company in Manisa
Ali Hasan ZUBAROĞLU, Ali BOZ, Selmur TOPAL, Fehminaz TEMEL, Mustafa Bahadır SUCAKLI, Belkıs LEVENT, Gonca ATASOYLU, Metin KIZILELMA
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.38991 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 209 - 218 
6. Characterization of sericin protein recovered from silk wastewaters
İpek atıklarından geri kazanılan serisin proteininin karakterizasyonu
Gökşen ÇAPAR, Seylan Saniye AYGÜN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.47113 (Dili: “İngilizce” - Language: “English”) 219 - 234 
- Olgu Sunumu / Case Report
7. Anjiyoimmunoblastik T-hücreli lenfomasi olan bir hastada çoklu ilaç dirençli *Corynebacterium mucifaciens*’in neden olduğu ölümcül bir sepsis olgusu
A fatal case of sepsis caused by multidrug-resistant *Corynebacterium mucifaciens* in a patient with an angioimmunoblastic T cell lymphoma
Fatma KÖKSAL-ÇAKIRLAR, Nevriye GÖNÜLLÜ, Mert KUŞKUCU, Kübra CAN, Seval ÜRKMEZ, Kenan MİDİLLİ, Nuri KIRAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.58224 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 235 - 240 
- Derleme / Review
8. Tarım çalışanlarının bitki koruma ürünleri konusunda bilgi ve davranışları
Knowledge and behavior of agricultural workers about the plant protection products
Ersin USKUN
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.54872 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 241 - 254 
9. Bitkilerde RNA interferans
RNA interference in plants
Sümer ARAS, Semra SOYDAM-AYDIN, Aslı FAZLIOĞLU, Demet CANSARAN-DUMAN, İlker BÜYÜK, Kürşat DERİCİ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.13285 (Dili: “Türkçe” - Language: “Turkish”) 255 - 262 
10. Molecular techniques for clinical diagnostic mycology
Mikolojik klinik tanıda moleküler teknikler
Nuri KIRAZ
Doi: 10.5505/TurkHijyen.2015.99705 (Dili: “İngilizce” - Language: “English”) 263 - 272 

Türkiye’de mikrobiyoloji laboratuvarlarının kültür ve antibiyotik duyarlılık testi performans değerlendirmesi ve Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemine veri sağlayacak laboratuvarların seçimi: Anket uygulaması

Performance evaluation of the microbiology laboratories in Turkey for culture and antibiotic susceptibility tests and the selection of laboratories to provide data for National Antimicrobial Resistance Surveillance System: Questionnaire application

Ayşegül GÖZALAN¹, Nilay ÇÖPLÜ², Dilber AKTAŞ³, Hüsnüye ŞİMŞEK³, Gül Bahar ERDEM², İpek MUMCUOĞLU⁴

ÖZET

Amaç: Antimikrobiyal direnç sorununun artmakta olması nedeniyle ülkemizde Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDDS) kurulma çalışmaları başlatılmıştır. UAMDDS’ye dahil olacak laboratuvarların sisteme güvenilir veri sağlayabilmesi önemlidir. Bu amaçla ülkedeki mikrobiyoloji laboratuvarlarının kültür ve antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) yapabilme kapasitelerini değerlendiren bir anket uygulaması yapılmıştır.

Yöntem: Bu çalışma 2009-2010 yılları arasında yapılmış olup mikrobiyoloji laboratuvarlarının kültür ve ADT yapabilme kapasitelerine odaklanan 90 soru içermektedir. Anket formları T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından mikrobiyoloji uzmanı bulunduğu bilgisine ulaşılan kamuya bağlı 354 hastanenin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Sonuçlar SPSS 18,0 istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Ankete %70,5’i devlet hastanesi, %16,5’i eğitim ve araştırma hastanesi ve %13’ü üniversite hastanesi olmak üzere 322 laboratuvar cevap vermiştir. Birinci basamak sisteme dahil olma kriterleri olan; mikrobiyoloji uzmanı bulunması (%99,1), bakteriyoloji bölümü olması (%97,5) ve kan kültürü çalışılması (%83,6) sorularının her üçüne de evet cevabı veren 259

ABSTRACT

Objective: Due to the increase in of the antimicrobial resistance problem, in our country, the studies to establish National Antimicrobial Resistance Surveillance System (NAMRSS) was started. It is important to provide reliable data for the laboratories those will be included in NAMRSS. For this purpose, a questionnaire was applied to evaluate the culture and antimicrobial susceptibility tests performance capacities (AST) of the laboratories in the country.

Method: This study was done between 2009 and 2010 years, and included 90 queries which were focused on the capacities of microbiology laboratories to perform culture and AST. The questionnaires were sent to medical microbiology laboratories of 354 public hospitals, where the presence of a specialist knowledge is achieved by TR Ministry of Health. Results were analysed by using SPSS 18.0 statistical program.

Results: Three hundred twenty two laboratories replied the questionnaire among which were 70.5% state hospital, 16.5% training and research hospital and 13% university hospital laboratories. The number of laboratories which have positive reply to all three questions which are the first stage of the selecton criteria; presence of microbiologist specialist (99.1%),

¹ Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, ANKARA

² Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, ANKARA

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, ANKARA

⁴ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Nilay ÇÖPLÜ

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü, ANKARA

Tel : +90 312 596 26 70

E-posta / E-mail : nilaycoplul@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 24.02.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 27.05.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.30306

Gözalın A, Çöplü N, Aktaş D, Şimşek H, Erdem GB, Mumcuoğlu İ. Türkiye’de mikrobiyoloji laboratuvarlarının kültür ve antibiyotik duyarlılık testi performans değerlendirmesi ve Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemine veri sağlayacak laboratuvarların seçimi: Anket uygulaması. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 175-82.

(%80,4) laboratuvar ileri değerlendirmeye alınmıştır. İkinci aşama olan skor çalışmasında kullanılan sorular ve bu sorulara verilen cevap yüzdeleri şöyledir: i) *Escherichia coli* (ortalama: 74,7), *Klebsiella* spp. (ortalama: 22,9), *Staphylococcus aureus* (ortalama: 19,6), *Pseudomonas aeruginosa* (ortalama: 19,5), *Enterococcus* spp. (ortalama: 16,1) ve *Streptococcus pneumoniae* (ortalama: 3,7), için uygulanan aylık ADT sayısının ortalama değerlerinin üzerinde olması, ii) klinik olarak anlamlı kabul edilen mikroorganizmalara veya izole edilen hastada klinik olarak önemli kabul edilen mikroorganizmalara kan izolatlari için sırasıyla %49,2 ve %30,2; BOS izolatlari için sırasıyla %88,7 ve %75,5 ADT uygulaması, iii) ADT için standart uygulama prosedürünün olması (%81,6), iv) iç kalite kontrol sonuçlarının gözden geçiriliyor olması (%82,2), v) ADT için standart yöntemlerden herhangi birinin kullanılıyor olması (%95,8), vi) ADT sonuçlarının yorumu için standart rehber kullanılması (%94,2) vii) sonuçların tutarlılığının değerlendirilmesi (%96,9) şeklindedir. 259 laboratuvaradan 173'ü skor belirleme sorularının tümüne cevap vermiş olup, bu laboratuvarların skor değerleri 4-7; 8-11 ve 12-15 olacak şekilde gruplandırılmıştır. Laboratuvarlardan 43/173 (%24,8)'ünün 12-15 skor grubuna dahil olduğu görülmüştür. Üniversite hastaneleri ve eğitim ve araştırma hastanelerinin büyük bir kısmı 12-15 arası skor puanı alırken (sırasıyla %64,9 ve %53,3'ü), devlet hastanelerinin büyük bir bölümünün 4-7 (%50) ve 8-11 (%47,2) arası skor puanı aldığı belirlenmiştir.

Sonuç: UAMDSS için katılımcı laboratuvar belirlerken; skor değerinin yüksek olması, Türkiye İstatistikî Bölge Birimleri Sınıflandırması'na göre belirlenen 12 bölgeye olabildiğince eşit dağılması ve üniversite, eğitim araştırma ve devlet hastanelerini içerecek şekilde olması dikkate alınmıştır. Buna göre UAMDSS'ye güvenilir veri sağlayabilecek katılımcı 78 laboratuvar seçilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal direnç, sürveyans

presence of bacteriology laboratory (97.5%) and performance of blood culture (83.6%), were 259 (80.4%) and they were included in further evaluation. The queries and percentage of the replies used for the second stage were: i) The number of AST performed to be more than the average monthly number for *Escherichia coli* (mean: 74.7), *Klebsiella* spp. (mean: 22.9), *Staphylococcus aureus* (mean: 19.6), *Pseudomonas aeruginosa* (mean: 19.5), *Enterococcus* spp. (mean: 16.1) and *Streptococcus pneumoniae* (mean: 3.7), ii) performance of AST when a microorganism that is generally accepted as clinically significant or significant for the patient from whom the microorganism was isolated; 49.2% and 30.2% for blood culture, and 88.7% and 75.5% for CSF, respectively, iii) the presence of standard operating procedures for AST (81.6%), iv) revising the internal quality control results (82.2%), v) usage of any of the standard methods for AST (95.8%), vi) using standard guidelines for the interpretation of results (94.2%), and vii) the evaluation of the consistency of the results (96.9%). Among 259 laboratories 173 of them replied all the queries for score determination, and these laboratories were grouped as 4-7; 8-11 and 12-15 according to their scores. Among 173 laboratories, 43 of them were found to be involved in the group 12-15 score. While most of the teaching and research hospitals and university hospitals received score 12-15 points (64.9% and 53.3% respectively), most of the state hospitals received 4-7 (50%) and 8-11 (47.2%) score points.

Conclusion: For the determination of participant laboratories; having a high score, equally distribution in 12 regions determined by Turkey Statistical Classification of Territorial Units include university, training and reserach and state hospitals were taken into consideration. Accordingly 78 laboratories which can provide reliable data for NAMRSS were chosen as participant.

Key Words: Drug resistance microbial, surveillance

GİRİŞ

Son yıllarda tüm dünyada antimikrobiyal direnç problemi giderek artmaktadır (1). Birçok sürveyans programının özellikle antimikrobiyal direnç ve nozokomiyal enfeksiyonlara odaklandığı

gözlenmektedir (2, 3). Antimikrobiyal direnç sürveyans sisteminin etkin bir şekilde yürütülebilmesi için yüksek morbitide ve/veya mortaliteye sahip, antimikrobiyal tedavi seçeneği kısıtlı, kolay

yayılabilen; bölgesel ve ulusal düzeyde bilgi toplanabilecek mikroorganizmalara odaklanılmalıdır. Ülkemizde ilk olarak; “Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans ve Kontrol Esasları Yönetmeliği” (30.05.2007 tarih ve 26537 sayılı RG-Madde 13/1)(4) gereği, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (eski adıyla Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı) koordinasyonunda, 2009 yılından itibaren Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) kurulma çalışmaları başlatılmış, ilk veriler 2011 yılında toplanarak rapor edilmiştir (5).

Sürveyans sistemlerinde enfeksiyon etkenleri ve antibiyotik dirençlerine ait veriler klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından toplanmaktadır (3). Bu nedenle mikrobiyoloji laboratuvarı sonuçlarının da güvenilir olması gereklidir. Oysa ülkemizde mikrobiyoloji laboratuvarlarının gerek kurumsal, gerek bölgesel dağılım bakımından farklı imkanlara ve donanımlara sahip oldukları bilinen bir gerçektir (6). Bu nedenle kurulmakta olan UAMDSS’ye veri sağlayacak laboratuvarın seçilmesi aşamasında ülkemizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarının kültür ve antibiyotik duyarlılık testi (ADT) yapabilme kapasitelerini değerlendirmeye yönelik bir anket uygulaması yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma 2009 - 2010 yıllarında yapılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü’nün dökümanları kullanılarak kültür ve ADT konusunda laboratuvarların kapasitesini değerlendirmeye yönelik bir anket formu hazırlanmıştır (7). Anket formu laboratuvarında çalışan personelin ünvan ve sayısı, kan kültürü ve ADT yapma kapasiteleri ve kullandıkları yöntemler, ADT uygulayan personel sayısı, belirtilen mikroorganizmalar için aylık uygulanan ADT ortalama sayısı, klinik örneklerden hangi mikroorganizmalara ADT uygulandığı, ADT sonuçlarının değerlendirilmesi ve rapor edilmesi bilgilerini içeren 90 sorudan oluşmaktadır.

Anket formları, kamuya bağlı olup T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından mikrobiyoloji uzmanı bulunduğu bilgisine ulaşılan 354 Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına posta yolu ile gönderilmiştir.

UAMDSS’ye veri sağlayacak laboratuvarın seçilmesi aşamasında ilk olarak “birincil kriterler” olan mikrobiyoloji uzmanı bulunması, bakteriyoloji bölümü olması ve kan kültürü çalışıyor olması özelliklerinin her üçüne sahip laboratuvarlar incelemeye alınmıştır. Bu laboratuvarlar arasından seçim yapabilmek için “skorlama” yöntemi kullanılmıştır. Skor çalışmasında kullanılan sorular ;

- i) *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. ve *Streptococcus pneumonia* için uygulanan aylık ADT sayısının grup ortalama değerlerinin üzerinde olması,
- ii) Kan ve BOS izolatlarında genellikle klinik olarak anlamlı kabul edilen mikroorganizmalara veya izole edilen hastada klinik olarak önemli kabul edilen mikroorganizmalara ADT uygulaması,
- iii) ADT için standart uygulama prosedürünün olması,
- iv) İç kalite kontrol sonuçlarının gözden geçiriliyor olması,
- v) ADT için standart yöntemlerden herhangi birinin kullanılıyor olması,
- vi) ADT sonuçlarının yorumu için standart rehber kullanılması,
- vii) Sonuçların tutarlılığının değerlendirilmesi şeklindedir.

Skor değeri yedi ve üzerinde olan laboratuvarlar değerlendirmeye alınmıştır.

Anket sorularına verilen cevapların sıklık ve yüzde dağılımları SPSS (Windows, versiyon 18) istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Anket gönderilen merkezlerin 322 (%91,0)’sinden cevap alınmıştır. Cevap veren merkezlerin %70,5’i devlet hastanesi, %16,5’i eğitim ve araştırma hastanesi ve %13’ü üniversite hastanesi laboratuvarlarıdır. Birincil kriterler olan mikrobiyoloji uzmanı bulunması (%99,1); bakteriyoloji bölümü içermesi (%97,5) ve kan kültürü çalışıyor olması (%83,6) sorularının her üçüne de evet cevabı veren 259 (%80,4) laboratuvar ileri değerlendirmeye alınmıştır.

Kriterlere uyan laboratuvarların aylık ADT sayılarının mikroorganizmalara göre dağılımı Tablo 1'de sunulmaktadır. ADT uygulama durumlarının klinik örneklere göre dağılımına (Tablo 2) bakıldığında, bazı laboratuvarların özellikle kan ve BOS gibi klinik önemi olan örneklerden izole edilen mikroorganizmaların tümüne ADT uyguladığı saptanmıştır (sırasıyla; %40,7, %64,6). ADT kalite standartlarına yönelik soruların cevapları (Tablo 3) değerlendirildiğinde; kalite kontrol şuşlarının düzenli test edilmesi (%57,7) ve dış kalite kontrol programlarına dahil olma (%18) yüzdelerinin düşük olduğu görülmüştür.

İkinci aşama olan skor çalışmasında kullanılan sorular ve bu sorulara verilen cevap yüzdeleri şöyledir:

i) *E. coli* (ortalama: 74,7), *Klebsiella* spp. (ortalama: 22,9), *S. aureus* (ortalama: 19,6), *P. aeruginosa* (ortalama: 19,5), *Enterococcus* spp. (ortalama: 16,1) ve *S. pneumoniae* (ortalama: 3,7), için uygulanan aylık ADT sayısının ortalama değerlerinin üzerinde olması,

ii) Klinik olarak anlamlı kabul edilen mikroorganizmalara veya izole edilen hastada klinik olarak önemli kabul edilen mikroorganizmalara kan izolatlari için sırasıyla %49,2 ve %30,2; BOS izolatlari için sırasıyla %88,7 ve %75,5 ADT uygulaması,

Tablo 1. Kriterlere uyan laboratuvarların aylık ADT sayılarının mikroorganizmalara göre dağılımı

Mikroorganizma	Antibiyotik Duyarlılık Testi Uygulama Değerleri		
	Ortalama	Standart Sapma	Alt-Üst limit
<i>E. coli</i>	74,7	86,2	3-530
<i>Klebsiella</i> spp.	22,9	38,9	0-350
<i>S. aureus</i>	19,6	25	1-180
<i>P. aeruginosa</i>	19,5	28,8	0-250
<i>Enterococcus</i> spp.	16,1	26,4	0-150
<i>Acinetobacter</i> spp.	15,2	30,7	0-270
<i>Enterobacter</i> spp.	8,4	13	0-90
<i>S. pneumoniae</i>	3,7	11,8	0-70
<i>Citrobacter</i> spp.	1,8	3,1	0-20
<i>H. influenzae</i>	1,3	4,4	0-30
<i>Salmonella</i> spp.	0,7	1,3	0-10
<i>Shigella</i> spp.	0,4	1	0-10
<i>Salmonella typhi</i>	0,3	0,8	0-3
<i>N. meningitidis</i>	0,1	0,5	0-5

Tablo 2. Kriterlere uyan laboratuvarların ADT uygulama durumlarının klinik örneklere göre dağılımı.*

Klinik Örnek	Tüm mikroorganizmalara	Genellikle klinik olarak anlamlı kabul edilen mikroorganizmalara	İzole edilen hastada klinik olarak anlamlı kabul edilen mikroorganizmalara
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Kan (n=258)	105 (40,7)	127 (49,2)	78 (30,2)
Gaita (n=258)	8 (3,1)	205 (79,5)	88 (34,1)
İdrar (n=258)	36 (14)	197 (76,4)	88 (34,1)
BOS (n=257)	166 (64,6)	228 (88,7)	194 (75,5)
Yara (n=258)	69 (26,7)	229 (88,8)	151 (58,5)
Genital Sistem (n=258)	8 (3,1)	208 (80,6)	95 (36,8)

* Her bir klinik örnek için birden fazla seçenek işaretleme söz konusudur.

Tablo 3. Kriterlere uyan laboratuvarların ADT kalite uygulamalarına yönelik bazı özellikleri

Özellik	Sayı (evet/toplam)	Yüzde (evet)
Uyguladığınız ADT ile ilgili aylık laboratuvar kayıtlarınız var mı ?	238/250	95,2
Laboratuvarınızda iç kaliteyi sağlamak amacıyla ADT için standart uygulama prosedürleri (SUP) var mı ?	200/245	81,6
Cevabınız evet ise SUP'leriniz yazılı mı ? Akış diyagramı içeriyor mu ?	169/204	82,8
Eğer var ise: SUP'leriniz kalite kontrol suşlarının düzenli test edilmesini içeriyor mu ?	112/194	57,7
İç kalite kontrol sonuçlarınızı gözden geçiriyor musunuz ?	171/208	82,2
Laboratuvarınız ADT ile ilgili herhangi bir dış kalite kontrol programına dahil mi ?	45/250	18
ADT yöntemlerinden herhangi birini kullanıyor musunuz ?	248/259	95,8
ADT yorumunda rehber kullanıyor musunuz ?	244/259	94,2
ADT sonuçlarını rapor ederken kısıtlı bildirim uyguluyor musunuz ?	219/258	84,9
ADT sonuçlarının tutarlılığı laboratuvar tarafından değerlendiriliyor mu ?	247/255	96,9

iii) ADT için standart uygulama prosedürünün olması (%81,6), iv) iç kalite kontrol sonuçlarının gözden geçiriliyor olması (%82,2),

v) ADT için standart yöntemlerden herhangi birinin kullanılıyor olması (%95,8),

vi) ADT sonuçlarının yorumu için standart rehber kullanılması (%94,2),

vii) Sonuçların tutarlılığının değerlendirilmesi (%96,9) şeklindedir.

259 laboratuvardan 173'ü skor belirleme sorularının tümüne cevap vermiş olup, bu laboratuvarların skor değerleri 4-7; 8-11 ve 12-15 olacak şekilde gruplandırılmıştır.

Üniversite hastaneleri ve eğitim ve araştırma hastanelerinin büyük bir kısmı 12-15 arası skor puanı alırken (sırasıyla %64,9 ve %53,3'ü), devlet hastanelerinin büyük bir bölümünün 4-7 (%50) ve 8-11 (%47,2) arası skor puanı aldığı belirlenmiştir. Türkiye İstatistikî Bölge Birimleri Sınıflandırması (TİBBS)'na göre belirlenmiş olan 12 bölgenin skor dağılımına bakıldığında en yüksek skora (12-15) sahip bölgelerin Batı Anadolu (38,1); İstanbul (%35) ve Ege Bölgesi (%33,3) iken en düşük skorlara (4-7) sahip bölgelerin Batı Marmara (%50); Orta Anadolu (%50) ve Ortadoğu Anadolu (%45,5) olduğu görülmüştür. Skor değerlerinin kurumlara ve bölgelere göre dağılımları Tablo 4 ve 5'de sunulmaktadır.

Ankete yanıt veren laboratuvarlar arasında 12-15 skoruna sahip laboratuvarların yüzdesi %24,8'dir.

Tablo 4. Kurumların skor değerlerine göre dağılımları

Kurum	SKOR			TOPLAM
	4-7	8-11	12-15	
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Üniversite Hastaneleri	1 (2,7)	12 (32,4)	24 (64,9)	37 (100)
Eğitim ve Araştırma Hastaneleri	1 (3,3)	13 (43,3)	16 (53,4)	30 (100)
Kamu Hastaneleri	53 (50)	50 (47,2)	3 (2,8)	106 (100)
TOPLAM	55 (31,8)	75 (43,3)	43 (24,9)	173 (100)

UAMDS için katılımcı laboratuvar belirlerken skor değerinin yüksek olması, TİBBS'ye göre saptanmış olan 12 bölgeye olabildiğince eşit dağılım sağlaması; üniversite, eğitim araştırma ve devlet

hastanelerini içerecek şekilde olması dikkate alınmıştır. Toplam 78 laboratuvar UAMDS'ye katılımcı olarak belirlenmiştir (Şekil 1).

Tablo 5. Bölgelerin skor değerlerine göre dağılımları

Laboratuvarların Bulunduğu Bölgeler	SKOR			TOPLAM Sayı (%)
	4-7	8-11	12-15	
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	
Batı Marmara	5 (50)	4 (40)	1 (10)	10 (100)
Orta Anadolu	5 (50)	3 (30)	2 (20)	10 (100)
Ortadoğu Anadolu	5 (45,1)	4 (36,4)	2 (18,2)	11 (100)
Akdeniz	8 (44,4)	7 (38,9)	3 (16,7)	18 (100)
Doğu Karadeniz	3 (33,3)	5 (55,6)	1 (11,1)	9 (100)
Güneydoğu Anadolu	4 (30,8)	7 (53,8)	2 (15,4)	13 (100)
Batı Anadolu	6 (28,6)	7 (33,3)	8 (38,1)	21 (100)
Batı Karadeniz	4 (25)	9 (56,2)	3 (18,8)	16 (100)
Ege	7 (25,9)	11 (40,7)	9 (33,4)	27 (100)
İstanbul	5 (25)	8 (40)	7 (35)	20 (100)
Doğu Marmara	3 (20)	8 (53,3)	4 (26,7)	15(100)
Kuzeydoğu Anadolu	0	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)
TOPLAM	55 (31,8)	75 (43,5)	43 (24,8)	173 (100)



Şekil 1. UAMDS'ye dahil edilen merkezlerin dağılımı

TARTIŞMA

Antimikrobiyal tedavi; 60 yıldan bu yana enfeksiyon hastalıklarına karşı kullanılan tıbbi müdahalelerin en önemli dayanak noktasıdır. Bununla birlikte, özellikle antibakteriyel ilaçların gerek toplumda gerekse gıda, tarım ve hayvancılıkta yanlış ve aşırı kullanılmaları dirençli bakterilerin seleksiyonu ve yayılımına yol açmıştır. Günümüzde antibakteriyel ilaçların tedavi etkinliklerinde sürekli bir azalmanın hatta kaybın gözlenmesi küresel bir tehdit olarak kabul edilmektedir. 1997 yılından bu yana kurulan birçok sürveyans modeli antimikrobiyal direnç konusuna dikkat çekmektedir (2, 8, 9).

Bu çalışmada ankete katılan laboratuvarlardan %80,4'ünde uzman bulunması; bakteriyoloji bölümü olması ve kan kültürü çalışılabilmesi yüz güldürücü bir sonuçtur. ADT uygulanan mikroorganizmaların dağılımı da beklendiği gibidir (10).

ADT uygulama durumlarının klinik örneklerle göre dağılımına (Tablo 2) bakıldığında, özellikle kan ve BOS gibi klinik önemi olan suşlarda bazı laboratuvarlarda tüm mikroorganizmalara ADT uygulandığı ifade edilmektedir (sırasıyla; %40,7, %64,6). Diğer klinik örneklerde bu oran daha düşük olmakla birlikte, tüm mikroorganizmalara ADT uygulanıyor olması bu konuya hassasiyet gösterilmesi gerektiğine işaret etmektedir. ADT kalite standartlarına yönelik soruların cevapları, “kalite kontrol suşlarının düzenli test edilmesi” ve “dış kalite kontrol programlarına dahil olma” hususlarının iyileştirilmesi gerektiğini düşündürürken, diğer parametrelerin %81,6 ile 96,9 arasında değişmesi memnuniyet vericidir.

Ülkemizdeki laboratuvarların skor puanlarının kurumsal dağılımına bakıldığında; 12-15 diliminde beklendiği gibi üniversite hastanelerinin (%64,9) en yüksek yüzdeyi gösterdiği, onu yakın arayla eğitim araştırma hastanelerinin (%53,3) izlediği ve

devlet hastanelerinin sadece %2,8'inin bu dilime girdiği saptanmıştır. Devlet hastanelerinin %50'sinin 4-7 skor dilimine girdiği görülmektedir. Toplamda 173 laboratuvarın 43 (%24,8)'ü 12-15 skor puanı almıştır. En yüksek skor açısından bölgeler arası farklara bakıldığında batı Marmara Bölgesi (%10) ile batı Anadolu Bölgesi (%38,1) sırasıyla alt ve üst sınırları oluşturmaktadır. Bu durumun başlıca nedeni skorlama kriterleri içerisinde “izole edilen mikroorganizmalar için uygulanan aylık ADT sayısının ortalama değerlerinin üzerinde olması” seçeneğinin bulunmasıdır. Ayrıca tüm yüzdelerin yalnızca anketin skor sorularını tam cevaplayan laboratuvarlara ait olduğu akılda tutulmalıdır. Bununla birlikte tüm anket sorularının cevapları genel olarak değerlendirildiğinde; mikrobiyoloji laboratuvarlarında medikal donanımın iyileştirilmesinin yanı sıra çalışan elemanların gerek hizmet içi eğitim gerekse performans ve benzeri uygulamalarla motive edilmesi önemlidir. Ülkemizde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının standardizasyonu konusuna ilgi gösterilmelidir.

Anket uygulaması ile ülkemizdeki mikrobiyoloji laboratuvarlarının genel durumu, ihtiyaçları ve kalite kriterleri konusundaki yaklaşımlarını saptamak ve bu yolla kurulmakta olan UAMDSS'ye güvenilir veri sağlayacak laboratuvarların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile bölgesel ve kurumsal dağılımın dengelendiği ve güvenilir veri sağlayacağı düşünülen laboratuvarlardan uygun bir örneklem oluşturulmuştur. Bu sayede UAMDSS verilerinin antimikrobiyal direnci düşürmeğe yönelik olarak alınacak olan önlemlere ışık tutması, alınan önlemlerin uzun vadede veriminin ölçülmesi ve benzeri etkinlikler için bilim adamlarına ve politika üreticilere yol göstermesi görevlerini yerine getirmesi mümkün olacaktır.

TEŞEKKÜR

Katılımcı laboratuvarların çalışanlarına anketi doldurup gönderdikleri ve bu yolla ülkedeki mikrobiyoloji laboratuvarlarının durum değerlendirmesi yapılabilmesini sağladıkları için teşekkür ederiz. IPA-2008 programı “Bulaşıcı Hastalıkların Sürveyansı ve Kontrolü Projesi”, Faz III. TR080216 projesi çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

UAMDSS Bilimsel Komisyonu; Şöhret AYDEMİR, Gülçin BAYRAMOĞLU, İsmail CEYHAN, Rıza DURMAZ, Mustafa ERTEK, Berrin ESEN, Mete EYİĞÖR, Zeynep GÜLAY, Deniz GÜR, Nezahat GÜRLER, Ufuk HASDEMİR, Ahmet MÜEZZİNOĞLU, Cüneyt ÖZAKIN, Duygu PERÇİN.

KAYNAKLAR

1. EARSS Annual Report 2008 On-going surveillance of *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* (http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008_EARSS_Annual_Report.pdf) (Erişim Tarihi: 15.01.2015).
2. Van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goossens H, et al. European Antimicrobial Resistance Surveillance System Group; European Surveillance of Antimicrobial Consumption Project Group. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerg Infect Dis*, 2008; 14(11): 1722-30.
3. Cantón R. Role of the microbiology laboratory in infectious disease surveillance, alert and response. *Clin Microbiol Infect*, 2005; 11(1): 3-8.
4. Bulaşıcı Hastalıklar Sürveyans Ve Kontrol Esasları Yönetmeliği, Resmi Gazete: 30.5.2007 - 26537. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-4958/bulasici-hastaliklar-surveyans-ve-kontrol-esaslar-yone-.html>
5. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2011 Yıllık Raporu, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 2013. (http://uamdss.thsk.gov.tr/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=6:raporlar&Itemid=13)(Erişim Tarihi:15.01.2015).
6. Akbaş E, Buyurgan V. Bildirimi zorunlu bulaşıcı hastalıklar için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının tanı kapasitelerinin değerlendirilmesi: Bir anket çalışması. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi; S8, s375, 12-16 Eylül 2006, Antalya.
7. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.1 Antimicrobial Resistance Surveillance Questionnaire for Assessment of National Networks Department Of Communicable Disease Surveillance And Response World Health Organization 2003.
8. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial SurveillanceProgram, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents*, 2014; 43(4): 328-34.
9. de Kraker ME, Jarlier V, Monen JC, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect*, 2013; 19(9): 860-8.
10. Mister P, Lehman DC. Bacteremia and Sepsis. Chapter 36 p.868-883. In: Mahan CR, Manuselis G (eds) *Textbook of Diagnostic Microbiology 5th ed.* Elsevier 2015 Saunders, Missouri. Printed in China.

Hastanede yatan ishaller hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi

Investigation of *Clostridium difficile* toxin in stool samples of patients hospitalized for diarrhea and analysis of the risk factors

Hande KOSTUL¹, Nuran DELİALİOĞLU¹, Elif ŞAHİN-HORASAN²,
Gürol EMEKDAŞ¹, Candan ÖZTÜRK¹, Necdet KUYUCU³

ÖZET

Amaç: Hastanede yatan özellikle geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda *Clostridium difficile* ilişkili ishal görülmektedir. *C. difficile*'nin patojenik suşları toksin A ve toksin B olmak üzere iki ekzotoksin oluşturmaktadır. Bu toksinler kolon mukozasında hasarlanma ve inflamasyona sebep olmaktadır. Kendini sınırlayan hafif bir ishalden ağır seyirli psödomembranöz enterokolite kadar değişen bir klinik tablonun gelişmesi söz konusudur. Antibiyotik kullanımı dışında ileri yaş, gastrointestinal endoskopi, nazogastrik tüpün varlığı, antiülser ilaç kullanımı, altta yatan ciddi hastalıklar, immün sistemin baskılanması, yoğun bakım ünitesi ve uzun süreli hastanede yatış diğer risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Kesin tanı; dışkıdan *C. difficile*'nin üretilmesi ve hücre kültüründe sitopatik etkiyi saptayarak toksin yapımının gösterilmesi ile konur. Ancak rutinde bu her zaman mümkün olmadığı için enzim immunoassay yöntemi ile toksinin gösterilmesi daha sık kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada hastanede yatan ve ishaller hastalardan gönderilen dışkı örneklerinde bağırsak florası, *C. difficile* Toksin A ve B varlığı ve risk faktörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmaya Eylül 2010-Ekim 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli kliniklerinde yatan ve ishaller hastalardan gönderilen 158 dışkı örneği dahil edilmiştir. Bu hastaların dışkı örneklerinde Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) yöntemiyle *C. difficile* toksin A/B araştırılmıştır.

ABSTRACT

Objective: The diarrhea related with the *Clostridium difficile* is seen especially in the patients hospitalized and using broad spectrum antibiotics. Pathogenic strains of *C. difficile* produce two exotoxins, toxin A and toxin B, which cause colonic mucosal injury and inflammation. It is possible to observe a clinical picture ranging from a mild self-limiting diarrhea to severe course of pseudomembranous enterocolitis. Besides antibiotic intake; advanced age, gastrointestinal endoscopy, presence of a nasogastric tube, receiving anti-ulcer medication, severe underlying illness, immunosuppression, intensive care unit and prolonged hospital stay are considered as other risk factors. The accurate diagnosis is established by producing *C. difficile* from the feces and demonstration of the toxin by determining the cytopathic effect in cell culture production. Since, this is not always possible in routine practice, demonstration of the toxin with enzyme immunoassay is a method used more often. The aim of this study was to investigate the intestinal flora from stool specimens of hospitalized patients and patients having diarrhea, existence of *C. difficile* toxin A and B and to determine the related risk factors.

Method: Stool specimens of 158 diarrhea patients hospitalized in various clinics which were sent to Department of Medical Microbiology Laboratory from Mersin University Medical Faculty Hospital between September 2010 and October 2011 were included in this study. Toxin A/B of *C. difficile* were investigated in the stool specimens of these patients with Enzyme-Linked

¹ Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

² Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

³ Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, MERSİN



İletişim / Corresponding Author : Nuran DELİALİOĞLU

Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, MERSİN

Tel : +90 324 241 00 00-2351

E-posta / E-mail : nurandel@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 31.03.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 30.07.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.36024

Kostul H, Delialioğlu N, Şahin-Horasan E, Emekdaş G, Öztürk C, Kuyucu N. Hastanede yatan ishaller hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin araştırılması ve risk faktörlerinin incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 182-90.

Ayrıca bu örnekler mikroskopik olarak incelenmiş ve rutin bakteriyolojik kültürü yapılmıştır.

Bulgular: Çalışmanın sonucunda; 18 (%11,4) hastada *C. difficile* toksin A/B pozitif olarak bulunmuş ve bu hastaların 15 (%83,3)'inin beta-laktam - beta-laktamaz inhibitörü grubu (penisilin, sefalosporin ve karbapenem) antibiyotik kullandığı görülmüştür. Toksin pozitif hastaların dışkı kültürlerinin bir tanesinde *Candida albicans* ürerken 17'sinde normal bağırsak flora bakterilerinin ürettiği tespit edilmiştir. Toksin pozitif ve negatif hastalarda incelediğimiz çeşitli risk faktörlerinden penisilin kullanımında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Sonuç: *C. difficile* hastanede yatan ve antibiyotik kullanan hastalarda ortaya çıkan ishallerde öncelikle akla gelmelidir. Bu amaçla dışkı örneklerinden toksin A ve B hızlı tanısı için özgülük ve duyarlılığı yüksek olan testler kullanılabilir. Sonuç olarak toksin pozitif olguların erken tanısı spesifik tedaviye başlanması ve etkili enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasını sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, toksin, ishal

Fluorescent Assay (ELFA) method. In addition, these samples were examined microscopically and routine bacteriological cultures were done.

Results: As a result of this study, *C. difficile* toxin A/B is found as positive in 18 (11,4%) patients and 15 of these patients (83,3%) had used, beta-lactam - beta-lactamase inhibitor group (penicillins, cephalosporins, and carbapenems) antibiotics. One of the toxin positive patients had *Candida albicans* while normal intestinal flora bacteria were grown in 17 of them. Using of penicillin was found to be statistically significant among the various risk factors studied in toxin positive and toxin negative patients.

Conclusion: *C. difficile* should be considered as the main cause of diarrhea particularly occurred in patients hospitalized and used antibiotics. For this purpose, tests which has high sensitivity and specificity may be used for rapid diagnosis of A and B toxins in stool samples. As a result, early detection of toxin positive cases will provide initiation of specific therapy and the implementation of effective infection control measures.

Key Words: *Clostridium difficile*, toxin, diarrhea

GİRİŞ

Clostridium difficile Gram pozitif sporlu anaerob basildir. Sağlıklı yetişkinlerin %0-3'ünün, sağlıklı yenidoğanların %25-80'inin dışkısında bulunmaktadır. Hastanede yatan hastaların %20'sinde; psödomembranöz koliti olan hastaların ise %95-100'ünde dışkıda *C. difficile* pozitif olarak bildirilmektedir. *C. difficile* ilişkili kolit en yaygın görülen nozokomiyal enfeksiyonlardan biridir (1). *C. difficile* sporları, kolonizasyon gelişmiş hastalardan ya da çevrelerindeki kişilerden temas sonucu alınabilmekte, çoğu zaman hastane personelinin elleri aracılığıyla taşınmaktadır. Elle taşınma önemli bir bulaş şekli olarak düşünülmektedir. Yapılan bir araştırmada, hastane personelinin eldiven kullanması sonucunda *C. difficile*'ye bağlı ishallerde beş kat azalma görüldüğü belirtilmiştir. *C. difficile* ısıya dirençli sporları nedeniyle hastane ortamında uzun süre canlı kalabilmektedirler (2). *C. difficile*

ilişkili kolit patogenezinde başlangıç antibiyotiklerle kolonun normal bakteriyel florasının bozulmasıdır. Bu durum *C. difficile* kolonizasyonuna sebep olmaktadır. Hastanede antibiyotik alan hastaların bulunduğu çevrede *C. difficile* yüksek orandadır. Yetişkin ve iki yaş üstündeki çocuklarda normal kolon mikroflorası *C. difficile* kolonizasyonunu engellemektedir (1).

C. difficile ilişkili enfeksiyon patogenezinde primer risk faktörleri; 65 yaş üstü, son üç ay içinde antibiyotik kullanımı ve hastanede yatmadır. Sekonder risk faktörleri arasında nazogastrik tüp uygulanması, sigara kullanımı, asit azaltan ajanlar (proton pompa inhibitörleri, H2 reseptör antagonistleri), malign hastalıklar, kemoterapi alınması bulunmaktadır (3). Antibiyotik aracılıklı diyarelerin %20'den fazlası ve antibiyotik ilişkili kolitlerin %60-75'inden ve psödomembranöz

kolitlerin %95'inden fazlasında *C. difficile* etken olarak bildirilmektedir (4). *C. difficile* ilişkili diyare ve kolitle sıklıkla ilişkili antibiyotikler ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler ve klindamisinidir. *C. difficile* enfeksiyonu tedavisinde ilk seçilen antibiyotik metranidazoldur. Normal kolon florasının yeniden oluşumu *C. difficile* kolonizasyonunu engeller ve klinik iyileşme oluşur. *C. difficile* patojenik suşları, toksin A enterotoksin ve toksin B sitotoksin olmak üzere iki potent toksin oluşturur. Her iki toksin de insan kolon epitel hücrelerine bağlanır ve hasar verir. Kolon mukozasında inflamasyon ve psödomembranlar oluşur. *C. difficile* enfeksiyonu klinik olarak asemptomatik taşıyıcılıktan, megakolon ve perforasyonların olduğu fulminan kolite kadar uzanabilir. Bunun sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte bakteri virulans faktörlerden çok konak faktörlerin önemli olduğu görünmektedir. Diyare genellikle antibiyotik tedavisi başladıktan 4-9 gün sonra oluşmaktadır. Hastaların üçte birinde antibiyotik kesildikten sonra diyare başlar. Kanser kemoterapisi kolonun mikroflorasını bozabilir ve kolonizasyon, diyare ve enfeksiyona yol açabilir (1).

Clostridium difficile ilişkili hastalık hayatı tehdit eden bir enfeksiyondur ve mortalite oranı %6-15 olarak bildirilmektedir. Bu enfeksiyonun hastanede yayılımının kontrol altına alınması gereklidir. Özellikle komplike enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisi alan hastalar daha sıklıkla enfeksiyona maruz kalmaktadır. Hastalığın doğru tanısı hastaların yönetilmesinde; yayılımının kontrol altına alınmasında ve sürveyans bilgilerinin elde edilmesinde önemlidir. *C. difficile* tanısında referans metod dışının hücre kültürünün yapılması ve sitotoksitenin antiserumlarla inhibisyonu ile gösterilmesidir. Bu test 2-3 günde tamamlanmaktadır. Günümüzde *C. difficile* toksin tanısında hızlı metodlar geliştirilmiştir. Her iki toksini tespit edebilen ticari testler bulunmaktadır. Diğer tanı metodları polimeraz zincir reaksiyonu ve glutamat dehidrogenaz varlığının araştırılmasıdır (5).

Bu çalışmada çeşitli kliniklerde yatan ve ishali hastalardan gönderilen dışkı örneklerinde *C. difficile*

toksin A ve B varlığının ve çeşitli risk faktörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Eylül 2010 - Ekim 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerde yatan ishali hastalardan gönderilen dışkı örnekleri çalışmaya alınmıştır. Bu dönemde yatan hastalardan toplam 878 adet dışkı örneği gönderilmiş olup bunlardan sulu, mukuslu ve yumuşak kıvamlı olan 158 adeti çalışmaya dahil edilmiştir. Bu örneklerin 47'sinin hasta yatışından bir gün sonra; 111'inin ise iki gün ve sonrasında geldiği tespit edilmiştir. Dışkı örnekleri makroskopik ve mikroskopik olarak incelenmiştir. Makroskopik incelemede dışkıların kıvamına, kan ve mukus olup olmadığına bakılmıştır. Mikroskopik incelemede ise eritrosit-lökosit varlığı ve protozoon kist-trofozoitleri araştırılmıştır. Bakteriyolojik kültür için örnekler kanlı agar, Eosin Methylene Blue (EMB) agar, Salmonella-Shigella (SS) agar ve Sabouraud Dextrose Agar besiyerlerine ekilmiştir. Bir miktar dışkı örneği steril 2 ml'lik iki adet ependorf tüpe alınarak *C. difficile* Toksin A/B araştırılması yapıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Besiyerleri etüvde 37 °C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra kültürde üreyen mikroorganizmaların koloni morfolojisi değerlendirilerek kolonilerden Gram boyama yapılmış ve mikroskopta incelenmiştir. Gram pozitif bakterilerin identifikasyonunda katalaz, koagülaz ve eskülin hidrolizi testleri, Gram negatif enterik bakterilerin identifikasyonunda ise klasik biyokimyasal yöntemler ve gerektiğinde otomatize bakteri identifikasyon sistemi (VITEK, bioMérieux) kullanılmıştır. Maya üremesi tespit edilen dışkı örneklerine germ tüp testi ile *Candida albicans* ve non-albicans ayrımı yapılmıştır.

Clostridium difficile Toksin A/B aranması

Dışkı örneklerinde *C. difficile* toksin A/B varlığının araştırılması için *C. difficile* Toksin A/B

kiti (lot numarası: 1000335200) kullanılarak (VIDAS, bioMérieux, Fransa) Enzyme-Linked Fluorescent Assay (ELFA) yöntemi ile VIDAS cihazında (bioMérieux, Fransa) firmanın önerdiği prosedüre göre çalışılmıştır. Testin prensibi; iki adım enzim immunoassay sandviç yöntemi ve bir floresan okumadır. Çalışma öncesi dışkı örnekleri santrifüj edilerek homojenize edildikten sonra test stripindeki uygun kuyucuğa eklenerek cihaza yerleştirilmiştir. Testin tüm adımları cihazda otomatik olarak çalışılmış ve yaklaşık test 75 dakika içinde tamamlanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılıma uymayan sürekli değişkenler medyan [çeyreklikler] şeklinde özetlenmiş ve grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testinden yararlanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir. Analizler MedCalc v.12.2.1. ve SPSS 11.5 paket programlarında yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 158 hastanın 86 (%54,4)'sı erkek 72 (%45,6)'sı kadındı. Bunların 84 (%53)'ü 0-18 yaş grubu, 54 (%34)'ü 19-64 yaş grubu ve 20 (%12,6)'si 65 ve üzeri yaş grubunda idi. *C. difficile* toksin A/B pozitifliği 18 (%11,4) hasta örneğinde saptanmıştır. Bunların yaş gruplarına göre dağılımında 16 (%88,8)'sının çocuk yaş grubunda, iki hastanın (%11,2) yetişkin yaş grubunda olduğu tespit edilmiştir. *C. difficile* toksin pozitif hastaların yaşlarına göre dağılımı; 2'si 0-6 aylık, 7'si 6-12 ay, 1'i 5 yaş ve 6'sı 10-13 yaş arasında, yetişkin iki hasta ise 33 ve 56 yaşlarında idi.

Dışkı örneklerinin mikroskopik incelemesinde; toksin pozitif bir örnekte *Entamoeba histolytica* / *E. dispar* kistleri ve toksin negatif altı örnekte *E. histolytica* / *E. dispar* kist ve trofozoitleri, bir örnekte ise *Giardia intestinalis* kistleri görülmüştür. Dışkı örneklerinden izole edilen mikroorganizmaların dağılımı Tablo 1'de

görülmektedir. Dışkı mikroskopisinde lökosit toksin pozitif hastaların altı (%33,3)'sında ve toksin negatif hastaların 52 (%37)'sinde lökosit görülmüştür.

Tablo 1. Hastaların dışkı kültürlerinde izole edilen mikroorganizmaların dağılımı

Kültür Sonucu	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar
	n (%)	n (%)
Normal flora bakterileri*	17 (94,5)	128 (91,4)
<i>Candida</i> spp.	1 (5,5)	9 (6,4)
<i>Salmonella</i> spp.	-	2 (1,5)
<i>Shigella</i> spp.	-	1 (0,7)
Toplam	18 (100)	140 (100)

* *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp. vb.

Çalışmadaki hastaların hastanede yatış süresi içinde aldıkları antibiyotiklere bakıldığında ilk sırayı sefalosporinler almakta onu karbapenemler takip etmekte daha sonra da sırayla florokinolonlar, penisilin, beta laktam+beta laktamaz inhibitörleri ve diğer antibiyotikler de bunları izlemektedir. *C. difficile* toksin A/B pozitif bulunan hastaların daha önce kullandığı antibiyotiklere bakıldığında beşinin (%28,5) penisilin grubu, üçünün (%16,5) sefalosporin grubu, üçünün (%16,5) karbapenem, ikisinin (%11,0) beta-laktam + beta-laktamaz inhibitörü, birinin (%5,5) penisilin + sefalosporin ve birinin (%5,5) sefalosporin + karbapenem kombinasyonu aldığı tespit edilmiştir. Toksin pozitif tespit edilen üç hastanın ise antibiyotik kullanım öyküsü bulunmadığı saptanmıştır (Tablo 2). Penisilin alanların almayanlara göre 6,34 kat daha fazla *C. difficile* toksin A/B pozitifliği saptanmıştır. (OR= 6,34 (1,81 - 22,24) $p = 0,004$). Antibiyotik kullanım süreleri ($p = 0,659$) bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Yatış süresince antibiyotik kullanma süresi ortanca değeri (medyanı) 15 gün olarak belirlenmiştir. Hastaların dışkı örneklerinde antibiyotiğe başladıktan ortanca 6,6 gün (min 0 - max 40 gün) sonra toksin A/B pozitifliği saptanmıştır. Yatıştan sonra pozitiflik için geçen süre ise ortanca değeri 10,4 gün (min 0 - max 58 gün) olarak tespit edilmiştir.

Tablo 2. Hastaların hastanede yattıkları süre içerisinde kullandıkları antibiyotikler

Antibiyotik Grupları	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	P değeri
	Sayı (%)	Sayı (%)	
Penisilin	5 (28,5)	8 (5,7)	0,006
Sefalosporin	3 (16,5)	57 (40,7)	0,080
Karbapenem	3 (16,5)	24 (17,2)	0,777
Beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü	2 (11,0)	11 (7,8)	0,986
Penisilin-Sefalosporin	1 (5,5)	5 (3,5)	0,810
Sefalosporin-Karbapenem	1 (5,5)	10 (7,1)	0,808
Florokinolon	-	16 (11,5)	
Aminoglikozit	-	2 (1,5)	
Glikopeptit	-	1 (0,7)	
Nitroimidazol	-	5 (3,6)	

Tablo 3. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların risk faktörlerinin değerlendirilmesi

Risk Faktörleri	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	P değeri
	Sayı (%)	Sayı (%)	
Hematolojik malignite	4 (22)	46 (33)	0,519
Nazogastrik tüp	4 (22)	15 (11)	0,304
Anti-ülser tedavi	8 (44)	76 (54)	0,591

Biyokimyasal test sonuçlarına bakıldığında toksin pozitif hastaların dördünde (%22,2) yüksek değerlerde lökosit varlığı ve 10 (%55,5)'unda yüksek C-reaktif protein (CRP) varlığı saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastalarda *C. difficile* için risk faktörlerinden olan hematolojik malignitesinin ve nazogastrik tüp uygulamasının ve altta yatan herhangi bir hastalığının olup olmadığı ve antiülser tedavi (proton pompa inhibitörü, H2 antagonist veya her ikisi) alıp almadıklarının dağılımı Tablo 3'de verilmiştir.

TARTIŞMA

C. difficile hastanede yatan hastalarda gelişen diyarelerin en yaygın sebeplerindendir. *C. difficile*'ye bağlı ishal sıklığını araştırmak için ülkemizde yapılan çalışmalarda toksin A-B pozitifliğinin %3,2 ile %24 arasında olduğu görülmektedir (6 - 15). Bizim çalışmamızda *C. difficile* toksin A/B %11,4 oranında pozitif olarak tespit edilmiştir.

C. difficile'ye bağlı ishal oluşumunda en önemli risk faktörü antibiyotik kullanımıdır. *C. difficile* ilişkili diyare ve kolit sıklıkla ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler ve klindamisin gibi antibiyotiklerle ilişkilidir (1). Erçis ve arkadaşları *C. difficile*'ye bağlı ishalin, hastaların büyük bir kısmında (32/68) beta laktam - beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının kullanımı sonucunda geliştiğini, bunu aminoglikozidlerin (12/68) ve sefalosporinlerin (8/68) izlediğini saptamışlardır (9). Altındış ve arkadaşları *C. difficile* toksin pozitif hastaların %84,6'sının ampisilin - sulbaktam, %7,7'sinin ise kotrimoksazol - SXT ve makrolid antibiyotik kullandığını belirlemişlerdir (11). Altuğlu ve arkadaşları toksin A pozitif bulunan hastaların beşinin üçüncü kuşak sefalosporin, birinin trimetoprim-sulfametoksazol ve birinin de siprofloksasin kullanmakta olduğunu saptamışlardır (16). Avustralya'da yapılan *C. difficile* ile ilişkili ishal olgularının incelendiği epidemiyolojik bir çalışmada; 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımının

kontrol altına alınması ile *C. difficile* ilişkili ishal olgularının azaltılabileceği bildirilmiştir (17).

C. difficile'ye bağlı ishalin oluşmasına neden olan diğer bir risk faktörü, altta yatan ciddi bir hastalığın varlığıdır. Kronik hastalığı olanların daha sık ve daha uzun süre hastanede yatmaları sebebiyle *C. difficile* ile kolonize olma ihtimali artmaktadır (18). Ercis ve arkadaşları *C. difficile* toksin A/B pozitif tespit ettikleri olguların %52,9'unda altta yatan bir hastalığın olduğunu, bunları da kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı, böbrek yetmezliği ve kanser olarak belirlediğini bildirmişlerdir (9). Altuğlu ve arkadaşları toksin A pozitif bulunan hastaların operasyon geçirmek, politravma, vaskülit, solid tümör, organik fosfat zehirlenmesi, beyin içi kanaması, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi nedenlerden dolayı yoğun bakımda yatmakta olduğunu tespit etmişlerdir (16). Çalışmamızda, *C. difficile* toksin A/B pozitif 18 hastanın dördünde (%22,2) hematolojik malignite ve dördünde (%22,2) nazogastrik tüp olduğu tespit edilmiştir. Hematolojik malignitenin olması ve nazogastrik tüp uygulaması ile *C. difficile* toksin A/B'nin pozitif ya da negatif olması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. *C. difficile* toksin A/B'nin pozitifliği ile anti ülser ilaç tedavisi alımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0,591$). Hastanede yatış süreleri ($p=0,317$) bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenememiştir.

Antibiyotik ilişkili ishal vakalarında sıklıkla karın ağrısı, ateş, lökositoz, dışkıda lökositler ve hipotalbüminemi görülmektedir (4). Antibiyotiğe bağlı ishal olguları sıklıkla kendini sınırlama eğilimindedir. İshal sıklıkla sulu, mukusludur ve kan bulunmaz. Kolit olgularında ise sistemik bulgular, dışkıda lökosit ve eritrosit tespit edilmektedir (19). Bizim çalışmamızda; mikroskopik incelemede toksin pozitif 18 örneğin ikisinde (%11) eritrosit, beşinde (%27) lökosit, birinde hem eritrosit ve hem lökosit varlığı saptanırken beş örneğin (%27) makroskopik görüntüsünün mukuslu olduğu görülmüştür. Kan lökosit değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,164$). CRP değerlerinin toksin negatif hastalarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. CRP değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,038$) (Tablo 4). Bunun nedeninin hastaların altta yatan diğer hastalıklarına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Salmonella türleri, *C. perfringens* tip A, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca* ve *C. albicans* gibi diğer enterik patojenlerde antibiyotik ilişkili diyare ile karışabilir. Klinik semptomları olan hastalarda *C. difficile* negatif bulunduğunda bu patojenler araştırılmalıdır (4). Altuğlu ve arkadaşlarının çalışmasında hastaların 21'ine bakteriyolojik kültür yapılmış, sadece bir tanesinde *Shigella flexneri* izole edilmiş. Toksin A pozitif hastaların hiçbirinde patojen bir bakteri saptanmamıştır (16). Aygün ve arkadaşları

Tablo 4. *C. difficile* toksin pozitif ve negatif hastaların risk faktörlerinin değerlendirilmesi

Biyokimyasal Testler	<i>C. difficile</i> toksin A/B pozitif hastalar	<i>C. difficile</i> toksin A/B negatif hastalar	P değeri
	medyan [çeyrekliiler]	medyan [çeyrekliiler]	
Lökosit	11.115 [6030 - 15120]	8.055 [3240 - 12790]	0,164
CRP yüksek	12,50 [2,00 - 51,50]	45,00 [9,75 - 145,75]	0,038

Salmonella, *Shigella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* varlığını araştırmak için aynı zamanda bakteriyolojik kültür yapmışlardır. Fakat hiçbirinde bu bakterilere rastlanmamış hepsinde normal flora elemanlarının ürediği görülmüştür (10). Çalışmamızda toksin pozitif hastaların birinde (%5,5) *C. albicans* ve 17 (%94,5)'sinde normal flora bakterileri üremiştir.

Dışkıda *C. difficile* toksin araştırması için altın standart doku kültüründe sitopatik etkinin gösterilmesidir. Doku kültürü ile toksin araştırılması zaman alıcı ve pahalı bir yöntemdir. Birçok merkezde enzim immunoassay (EIA); toksin A ve B'yi saptamada hızlı sonuç alınması nedeniyle rutin uygulamada tercih edilen bir yöntemdir (20). *C. difficile* tanısında önceleri toksin A ve sonra toksin A ve toksin B araştırılan EIA testleri yaygın olarak kullanılmaktaydı. Son zamanlarda tanıda *C. difficile* hücre duvar antijeni glutamat dehidrogenaz (GDH) testinin toksin A ve B EIA'den daha duyarlı olduğu bildirilmektedir. *C. difficile* tanısında test algoritmasının değerlendirildiği bir çalışmada; sitotoksin nötralizasyon testi referans yöntem olarak kullanıldığında hızlı immunokromotografik testlerle GDH ve toksin A ve B taranması ile bir saat içinde örneklerin %90'ında doğru sonuç alındığı, kalan %10 örnekte ise algortimada üçüncü bir testin gerekli olduğu tespit edilmiştir. Bu testin sitotoksin nötralizasyonu, toksijenik kültür veya polimeraz zincir reaksiyonu ile toksin ve toksin genlerinin araştırılmasından birinin olabileceği bildirilmektedir. ABD'de 2004 yılında *C. difficile* tanısında laboratuvarların kullandığı

testler değerlendirildiğinde; %42'si katı faz EIA ile *C. difficile* toksin A ve B, %26'sı hızlı immunokromotografik testler ile toksin A/B veya/ve GDH araştırdıkları bildirilmiştir. Hızlı immunokromotografik testlerdeki gelişmelerle 2008 yılında %46 laboratuvar bu metodu kullanırken, %43'ünün EIA metodlarını kullanmakta olduğu tespit edilmiştir (21).

Sonuç olarak; çocuk yaş grubunda toksin pozitifliği daha yüksek oranda belirlenmiş ve toksin pozitif grupta penisilin kullanımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Araştırılan diğer risk faktörleri (hematolojik malignitenin olması, nazogastrik tüp uygulaması, anti ülser ilaç tedavisi) ve hastanede yatış süreleri bakımından toksin negatif ve pozitif gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Bunun sebebinin toksin pozitif gruptaki hasta sayısının az olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. *C. difficile* hastanede yatan ve başta antibiyotik kullanan hastalarda gelişen ishallerde öncelikle akla gelmelidir. Tanı için toksin oluşumunun gösterilmesi gereklidir. Rutin laboratuvarlarda *C. difficile* toksin tespiti için duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan EIA testleri veya immunokromotografik yöntemler tercih edilebilir. Böylece toksin pozitif hastalar belirlenerek bulaşmayı önlemek için izole edilmesi ve uygun tedavi alması sağlanır. Aynı zamanda çevresel hijyen ve el yıkama gibi enfeksiyon kontrol önlemleri alınarak *C. difficile*'nin hastane ortamında hastalar arasında yayılımı önlenmiş olacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın istatistik analizlerinin yapılmasında katkılarından dolayı Prof. Dr. Arzu KANIK ve Arş. Gör. Didem DERİCİ'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Kelly CP, LaMont T. *Clostridium difficile* infection. Annu Rev Med, 1998; 49: 375-90.
2. Di Persio JR, Varga FS, Conwell DL, Kraft JA, Kozak KJ, Willis DH. Development of a rapid enzyme Immunoassay for *Clostridium difficile* Toxin A and Its use in the diagnosis of *C. difficile*-associated disease. J Clin Microbiol, 1991; 29(12): 2724-30.
3. Stanley JD, Bartlett JG, Dart BW IV, Ashcraft JH. *Clostridium difficile* infection. Curr Probl Surg, 2013; 50(7): 302-37.
4. Coté GA, Buchman AL. Antibiotic-associated diarrhoea. Expert Opin Drug Saf, 2006; 5(3): 361-72.
5. Planche T, Aghaizu A, Holliman R, Riley P, Poloniecki J, Breathnach A, et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: A systematic review. Lancet Infect Dis, 2008; 8(12): 777-84.
6. Boral ÖB. *Clostridium difficile* enfeksiyonu ön tanımlı hastaların dışkı örneklerinde Toksin A ve B'nin belirlenme sıklığı. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2002; 32(3-4): 220-4.
7. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Hastanede yatarken gelişen ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+B araştırılması. ANKEM Derg, 2002; 16(1): 82-4.
8. Deniz U, Ülger N, Aksu B, Karavuş M, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan ishalleri hastalardan izole edilen *Clostridium difficile* kökenlerinde toksin genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2011; 45(1): 1-10.
9. Ercis S, Ergin A, Haşçelik G. *Clostridium difficile*'ye bağlı ishal olgularının 6 yıllık değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul, 2004; 38(1-2): 45-50.
10. Aygün G, Aslan M, Yaşar H, Altaş K. Antibiyotikle ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* Toksin A+B araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2003; 33(1): 39-41.
11. Altındiş M, Usluer S, Çiftçi İH, Tunç N, Çetinkaya Z, Aktepe OC. Antibiyotiğe bağlı ishal olgularında *Clostridium difficile* varlığının kültür ve toksin saptama yöntemleriyle araştırılması. Mikrobiyol Bul, 2007; 41(1): 29-37.
12. Tunçcan ÖG, Ulutan F, Karakuş R. Antibiyotiğe bağlı ishal gelişen nötropenik ve nötropenik olmayan hastalarda *Clostridium difficile* toksin sıklığı ve risk faktörlerinin analizi. Mikrobiyol Bul, 2008; 42(4): 573-83.
13. Gündem SV, Özdemir M, Baysal B, Baykan M. Antibiyotik ilişkili ishal olgularında toksijenik *Clostridium difficile* varlığının ve risk faktörlerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2012; 42(2): 73-7.
14. Ayarç AO, Özakin C, Oral B, İlbaş AR, Sınırtaş M, Sığırlı D, et al. İshalleri olgularında *Clostridium difficile* toksin pozitifliğinin retrospektif analizi. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 2012; 42(1): 10-15.
15. Lale Z, Doğruman Al F, Fidan I, Adıyaman G, Yeşilyurt E, Özkan S, et al. İshalleri hastaların dışkı örneklerinde *Clostridium difficile* toksin A/B sıklığının araştırılması. ANKEM Derg, 2013; 27(2): 55-9.
16. Altuğlu İ, Aydemir Ş, Zeytinoğlu A, Erensoy S, Bilgiç A. Antibiyotikle ilişkili nozokomiyal diyarelerde *Clostridium difficile* Toksin A araştırılması. Turkish Journal of Infection, 2001; 15(4): 495-7.
17. Thomas C, Stevenson M, Williamson DJ, Riley TV. *Clostridium difficile*-associated diarrhea: Epidemiological data from Western Australia associated with a modified antibiotic policy. Clin Infect Dis, 2002; 35(12): 1457-62.
18. Barbut F, Petit JC. Epidemiology of *Clostridium difficile* associated infections. Clin Microbiol Infect, 2001; 7(8): 405-10.
19. Aygün G. Antibiyotiğe Bağlı İshaller. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. Cilt 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 1087-93.
20. Özinel MA. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak *Clostridium difficile*. Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 2001; 5(3): 251-4.
21. Schmidt ML, Gilligan PH. *Clostridium difficile* testing algorithms: What is practical and feasible? Anaerobe, 2009; 15(6): 270-73.

Mardin Devlet Hastanesi'nde 2011-2013 yılları arasında metisiline dirençli stafilocoklarda direnç profilleri

Resistance patterns of the methicillin resistant staphylococci between 2011 and 2013 in Mardin State Hospital

Filiz ORAK¹

ÖZET

Amaç: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), ilk kez 1961 yılında tanımlandıktan sonra, özellikle antibiyotik direnci yönünden tüm dünyada önemli bir problem haline gelmiştir. MRSA suşları sıklıkla penisilinaza dirençli penisilinler, sefalosporinler dahil tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere ve beta-laktam grubu dışı bazı antibiyotiklere de dirençli olup sadece vankomisin ile teikoplanine duyarlıdır. Bu çalışmanın amacı, Mardin Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci ile birlikte çeşitli antibiyotiklere direnç durumunun araştırılmasıdır. Metisilin direncinin doğru olarak belirlenmesi uygun antimikrobik ilacın kullanımını sağlamak için gereklidir.

Yöntem: Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 73 stafilocok suşu kullanılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testi olarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılmıştır. Suşların metisilin dirençlerinin araştırılması amacıyla, %4 NaCl içeren Mueller-Hinton Agar (RTA, TR) ve 1 µg'lık oksasilin diski (Bioanalyse, TR) kullanılmıştır.

Bulgular: Suşların 22 (%30,1)'si MRSA, dokuzu (%12,3) MRCNS (Metisiline Dirençli Koagülaz Negatif *S. aureus*) ve 42 (%57,5)'si MSSA (Metisiline Duyarlı *S. aureus*) olarak belirlenmiştir. MRSA suşlarının beşi (%22,7) ve MRCNS suşlarının da üçü (%33,3) hastane kaynaklı olarak tespit edilmiştir. MRSA suşları eritromisine %81,8, sefoksitine

ABSTRACT

Objective: After the report of first case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) had been described in 1961, MRSA became a major problem worldwide especially because of antibiotic resistance. MRSA strains are often resistant to beta-lactam antibiotics such as penicillinase resistant penicillins, cephalosporins and to some non-beta-lactam antibiotics, but they are only susceptible to vancomycin and teicoplanin. The aim of our study was to evaluate the resistance of *Staphylococcus* strains isolated at Mardin State Hospital against methicillin and various other antimicrobials. Accurate assessment of methicillin resistance is necessary to ensure proper use of antimicrobial drugs.

Method: In this study, 73 *Staphylococcus* strains isolated from various clinical specimens were evaluated. As antimicrobial susceptibility testing was performed using the Kirby-Bauer disc diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria. Mueller-Hinton Agar (RTA, TR) containing 4% NaCl and 1 µg oxacillin disc (Bioanalyse, TR) were used for determining methicillin resistance.

Results: Of the strains tested, 22 (30.1%) were found to be (MRSA), nine (12.3%) were methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS) and 42 (57.5%) were methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA). Five (22.7%) of the MRSA strains, and three (33%) of the MRCNS strains were identified as nosocomial. 81.8% of the MRSA strains were found to be resistant to erythromycin; 66.6%

¹ Özel Elitpark Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ÇORUM



İletişim / Corresponding Author : Filiz ORAK

Özel Elitpark Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, ÇORUM

Tel : +090 506 337 10 46

E-posta / E-mail : drfilizorak@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 15.05.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 05.04.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.78309

Orak F. Mardin Devlet Hastanesi'nde 2011-2013 yılları arasında metisiline dirençli stafilocoklarda direnç profilleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 191-8.

%66,6, gentamisine %60; amoksisilin/klavulanik asit, penisilin ve norfloksasine %100 dirençli bulunmuştur. MRSA ve MRCNS suşlarında penisiline %100 oranında direnç saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmaya alınan hiçbir suşta vankomisin ve teikoplanine direnç bulunmaması sevindirici bir gelişmedir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılığı, direnç, metisilin, stafilocok

to cefoxitin; 60% to gentamicin; and 100% to amoxicillin/clavulanic acid, norfloxacin and penicillin. The resistance rates to penicillin among the MRSA and MRCNS strains were determined to be 100%.

Conclusion: It is a welcome development to find that there was no resistance to vancomycin and teicoplanin strains tested in this study.

Key Words: Antibiotic susceptibility, resistance, methicillin, staphylococci

GİRİŞ

Stafilocoklar önemli enfeksiyon etkenleri olarak 100 yıldan uzun bir süredir tıp dünyasını meşgul etmektedir.

1960 yılında metisilin, daha sonra da diğer penisilinaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesiyle birlikte stafilocokal enfeksiyonların tedavisinde önemli aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir süre içerisinde (1961) stafilocoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970'li yıllardan itibaren de metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci problemi ortaya çıkmıştır (1).

Metisiline duyarlı ve dirençli stafilocoklar arasındaki temel fark, penisilin bağlayan protein (PBP)'lerdedir. Metisilin direnci, duyarlı suşlarda bulunmayan PBP 2a (PBP2') denilen proteinin varlığına bağlıdır. Direncin nedeni olan 2a'yı kodlayan gen kromozomal DNA üzerinde "mec" (metisilin direnç geni) olarak adlandırılan bölgedir (2). Metisilin direncinin düzenlenmesinde mec bölgesi dışında "factors essential for the expression of methicillin resistance" (fem) genleri olarak tanımlanmış genler de görev almaktadır (3). MRSA'da metisiline duyarlı *S. aureus*'da bulunmayan ve SCCmec olarak isimlendirilen bir direnç adası bulunmaktadır (4). MRSA suşlarının çoğu beta-laktam yapısındaki antibiyotiklerin yanı sıra aminoglikozidler, kinolonlar,

klindamisin ve karbapenem gibi birçok antibiyotiğe de dirençlidirler (5, 6). *S. aureus* nozokomiyal yara enfeksiyonlarında en sık saptanan etkindir. Bunu enterokoklar ve koagülaz-negatif stafilocoklar izlemektedir (1). Toplumsal yaşamda, toplum kökenli MRSA, önemli bir enfeksiyon olarak ortaya çıkmıştır. Başlıca cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu olmakla birlikte pnömoni ve ampiyem gibi şiddetli pulmoner enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Toplum kökenli MRSA, sağlık hizmeti ile ilişkili olanların aksine, geniş bir antibiyotik grubuna duyarlıdır. Toplum kökenli MRSA, sıklıkla, nötrofillerin hücre membranlarında litik porlar oluşturan, inflamasyon ve doku yıkımını başlatan nötrofil kemotaktik faktörlerin salınımını indükleyen Panton-Valentine lökosidini (PVL) kodlayan geni taşımaktadır (7).

Hastane kökenli ve toplum kökenli MRSA'ların epidemi yapma potansiyeli olduğundan halk sağlığı yönünden büyük önem taşımaktadır (8).

Bu çalışmada, Mardin Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci ile birlikte çeşitli antibiyotiklere direnç durumunun araştırılmasını amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2011 - Ağustos 2013 tarihleri arasında başhekimlik onayı alınarak, Mardin Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 73 stafilocok suşu retrospektif olarak değerlendirmeye alınmıştır. Gelen örnekler, %5 koyun kanlı agar, McConkey Agar (RTA, TR) ve DNaz besiyerlerine ekilerek, 18-24 saat 35-37 °C'de inkübe edilmiştir. DNaz besiyerinde üreyen ve kanlı agarda üreyen izolatlar, Gram boyama, katalaz (ORBAK, TR) ve tüp koagülaz testleriyle tanımlanmıştır. *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak tanımlanan izolatların oksasilin ve diğer antibiyotiklere [vankomisin, teikoplanin, penisilin, klindamisin, eritromisin, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, levofloksasin ve gentamisin (Bioanalyse, TR)] duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır (9). Buna göre 24 saatlik bakteri kültüründen 0,5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde doğrudan koloni süspansiyonu hazırlanmış ve %4 NaCl içeren Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyeri yüzeyine eküvyon yardımıyla yayılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra diskler yerleştirilmiş ve 35 °C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları değerlendirilmiştir. Metisilin direnci CLSI kriterleri doğrultusunda 1µg oksasilin diski (<10 mm ise dirençli, >13 mm ise hassas) ve 30 µg sefoksitin diski (<21 mm ise metisiline dirençli, >22 mm ise metisiline hassas) ile %2 NaCl eklenmiş MHA'da disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Gerek *S. aureus* gerekse KNS suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi için vankomisin, teikoplanin, penisilin, klindamisin, eritromisin, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, levofloksasin, norfloksasin, linezolid ve gentamisin (Bioanalyse, TR) kullanılmıştır.

BULGULAR

Araştırmaya alınan stafilocok suşları, çeşitli kliniklerden getirilen örneklerden izole edilmişlerdir (Tablo 1). MRSA suşlarının beşi (%22,7) ve MRCNS

suşlarının da üçü (%33,3) hastane kaynaklı olarak tespit edilmiştir. MRSA suşlarının sekizi (%36,6) ile Metisiline Hassas Staphylococcus (MSS) suşlarının 21 (%50)'i burun sürüntü örneklerinden elde edilmiştir. MRCNS suşlarının çoğunluğu ise idrar örneklerinden izole edilmişlerdir (Tablo 2).

Tablo 1. İzole edilen stafilocok suşlarının kliniklere göre dağılımı

Klinik	MRSA	MRCNS	MSS
	Sayı (n)	Sayı (n)	Sayı (n)
Üroloji Pol.	4	2	6
Göğüs Hastalıkları Pol.	3	2	3
Nöroloji Servisi	1	0	0
Genel Yoğun Bakım	2	1	0
Enfeksiyon Hastalıkları	8	0	19
Genel Cerrahi Pol.	1	0	5
Acil Pol.	1	0	0
KBB Pol.	1	0	6
Yoğun Bakım	1	1	0
Dahiliye	0	3	3
Toplam	22	9	42

MRSA: (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA (Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus*) MSSA: Methicillin susceptible *Staphylococcus aureus*, MRCNS: (Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci)

Tablo 2. İzole edilen MRSA ve MRCNS suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	MRSA	MRCNS	MSS
İdrar	18	5	5	8
Balgam	10	4	3	3
Burun sürüntüsü	29	8	0	21
Kulak sürüntüsü	7	1	0	6
Yara	6	2	1	3
Boğaz	1	0	0	1
Kateter ucu	1	1	0	0
Üretral akıntı	1	1	0	0
Toplam	73	22	9	42

Çalışmaya alınan 73 *Staphylococcus* suşunun 22 (%30,1)'si MRSA, dokuzu (%12,3) MRCNS ve 42 (%57,5)'si MSS olarak belirlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testleri değerlendirildiğinde, hiçbir suşta vankomisin, teikoplanin ve linezolid direnç saptanmamıştır. Her bir antibiyotik direnç oranı, kullanıldığı suşa göre değerlendirilerek hesaplanmıştır. MRSA ve MRCNS suşları penisiline %100 dirençli iken MSS suşlarında bu direnç %83,3 olarak bulunmuştur. MRSA suşlarından eritromisin duyarlılığına bakılan 11 suştan dokuzu (%81,8), sefoksitin duyarlılığına bakılan dokuz suştan altısı (%66,6), gentamisin duyarlılığına bakılan beş suştan üçü (%60) ve amosisilin/klavulanat duyarlılığına bakılan beş suştan beşi (%100) dirençli bulunmuştur. MRCNS suşları ise sefoksitine %80, amoksisilin/klavulanik asite %80 ve eritromisine %87,5 dirençli bulunmuştur. MSS suşlarının amoksisilin/klavulanik asit ve eritromisine direnç oranları sırasıyla %66,6 ve 17,6'dır (Tablo 3).

TARTIŞMA

Hem toplum hem de hastane kökenli stafilokoklar sistemik ve lokal birçok enfeksiyona neden olmaları yanında son yıllarda antimikrobiyal ajanların çoğuna dirençli hale gelmeleri nedeni ile de önemi artan bakterilerdir (10). Stafilokoklar Türkiye'de ve tüm dünyada en yaygın hastane enfeksiyonu etkenlerindedir. MRSA suşlarının ve KNS'ların, hastane enfeksiyonlarında büyük rol sahibi oldukları görülmektedir (2). *S. aureus* fronkül, karbonkül, apse gibi çeşitli deri lezyonlarından, yara enfeksiyonlarından ayrıca pnömoni, osteomyelit gibi daha birçok enfeksiyonlardan izole edilmişlerdir (5). *S. aureus*'un çeşitli çalışmalarda; toplum kökenli (TK) pnömonilerin %8-68'inden, hastane kökenli (HK) pnömonilerin ise %18'inden sorumlu olduğu bildirilmektedir (11).

KNS'ler cildin normal florası içinde yer alan bakteriler olup, genellikle konakla selim ilişkiler içinde saprofit olarak bulunmaktadır (12). Ancak cilt travması, intravenöz kateter kullanılması gibi invaziv girişimlerde ve şant sistemleri, yapay kalp kapakçığı, eklem protezi bulunması durumunda bu yabancı cisimlerin yüzeyine yapışabilme, immün

Tablo 3. MRSA ve MRCNS suşlarının antimikrobiyal direnç sonuçları

Antibiyotik	MRSA Dirençli	MRCNS Dirençli	MSS Dirençli
	Sayı (n)	Sayı (n)	Sayı (n)
Vankomisin	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Teikoplanin	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Linezolid	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Amoksisilin/klavulanik asit	5/5 (%100)	4/5 (%80)	2/3 (%66,6)
Sefoksitin	6/9 (%66,6)	4/7 (%57,1)	0 (%0)
Gentamisin	3/5 (%60)	0 (%0)	0 (%0)
Norfloksasin	3/3 (%100)	- -	0 (%0)
Penisilin	13/13 (%100)	7/9 (%77,7)	10/12 (%83,3)
Levofloksasin	2/7 (%28,5)	2/5 (%40)	0 (%0)
Klindamisin	3/5 (%60)	0 (%0)	0 (%0)
Eritromisin	9/11 (%81,8)	7/8 (%87,5)	3/17 (%17,6)

sistemden kaçabilme veya bu sistemi kırabilme yeteneklerine bağlı olarak çoğalmakta ve enfeksiyon oluşturabilmektedirler (13). KNS'ler üzerinde yapılan duyarlılık çalışmalarında, *S. aureus* türlerinden daha yüksek metisilin direnci gösterdikleri belirlenmiştir. Nozokomiyal KNS izolatlarının %60'ı metisiline dirençli olarak tespit edilmiştir (14). KNS'lerin de yaklaşık %80-90'ı indüklenebilir beta laktamaz üretmektedir. Direnç mekanizmasında düşük afiniteli bir PBP-a rol oynamaktadır. Bir çalışmada, neonatal sepsisli hastaların kanından izole edilen KNS'lerde, multipl polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışılmış ve izole edilen 85 KNS'nin 73 (%86)'ünde mecA geni pozitif ve 12 (%14)'sinde mecA geni negatif bulunmuştur. mecA-negatif izolatların hiç birinde PBP-2a'ya rastlanmamış ve β -laktam antibiyotiklere direnç saptanmamıştır (14, 15).

Yapılan çalışmalarda, hastaneye başvurudan sonraki ilk 48-72 saat içerisinde gelişen MRSA enfeksiyonları toplum kökenli olarak tanımlanmaktadır. Toplum kaynaklı MRSA enfeksiyonları, Kuzey Amerika ve Avrupa dahil olmak üzere hemen her coğrafi bölgede saptanmaya başlanmış ve bazı yerlerde %20'lere varan oranlar görülmüştür (16). Bizim çalışmamızda da MRSA suşlarının 17 (%77,3)'si ve MRCNS suşlarının da 6 (%66,7)'sı toplum kaynaklı olarak tespit edilmiştir. Özgüven ve ark. (17) ilköğretim ve lise öğrencileri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, burun MRSA taşıyıcılığı saptanmamış ve MSS taşıyıcılık oranı ise %14,7 olarak bulunmuştur. Çıtak ve ark. (18) hastane kaynaklı stafilokok suşlarının %40'ını, toplum kaynaklı stafilokok suşlarının ise %31'ini MRSA olarak tespit etmişlerdir. Duman ve ark. (19) toplum kökenli suşların %12,5'ini, hastane kökenli suşların da %43'ünü metisiline dirençli olarak bulmuşlardır. Özel ve ark. (20) PBP2a lateks aglütinasyon yöntemi ile KNS'lerin %54,1'ini, *S. aureus*'ların %42,4'ünü metisiline dirençli bulmuşlardır. Opuş ve ark. (21) Konya'da yaptıkları bir çalışmada 85 dirençli suşun 35 (%41)'ini MRSA, 50 (%59)'sini KNS olarak tespit etmişlerdir. Stafilokoklarda görülen metisilin direnci, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de giderek artış göstermektedir.

Vural ve ark. (22). bir çalışmada oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks aglütinasyon testlerinin duyarlılıklarını %100 ve özgüllüklerini sırasıyla %100, %100, %100 ve %97 olarak bulmuşlardır.

ABD'de MRSA oranı 2006-2007 yıllarında %79 olarak bulunmuştur (23). European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) 2008 verilerine göre, MRSA oranları Kuzey Avrupa ülkelerinde %5'in altında, İngiltere, İspanya, İtalya, Türkiye ve Yunanistan'da %25'in üzerinde, Malta ve Portekiz'de ise %50'lerde seyretmektedir (24).Türkiye'deki çeşitli merkezlerde MRSA görülme oranı %57, %58,5, %62 ve %33 gibi değerlerde bulunmuştur (25-27). Bizim çalışmamızda MRSA oranı %30,1 ve MRCNS oranı %12,3 olarak belirlenmiştir.

Ekşi ve ark. (28) yaptığı çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da vankomisin ve teikoplanine direnç saptanmamıştır. Güler ve ark. (29) gentamisine %84, klindamisine %63, eritromisine %77 oranında, vankomisin ve teikoplanine %0 direnç bulmuşlardır. Çıtak ve ark. (18) MRSA suşlarının gentamisine %77, siprofloksasin ve tetrasikline %74 ve eritromisine de %78 oranında direnç bildirmişlerdir. Ekşi ve ark. (28) ise gentamisine %76, rifampine %73 ve siprofloksasine %85,9 oranında direnç oranı saptamışlardır. Aynı araştırmacılar MSS suşlarının penisiline direnç oranını %91,1 bulurken en duyarlı oldukları antibiyotikleri meropenem, sefotaksim ve siprofloksasin olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda MSS'lerin penisilin direnci %83,3 iken, eritromisin direnci %17,6 bulunurken, MRCNS'lerde penisilin direnci %77,7, eritromisin direnci de %87,5 olarak bulunmuştur.

Gerek MRSA gerekse MRCNS'lerde vankomisin ve teikoplaninin yanı sıra kinolonların, linezolid, levofloksasin ve klindamisin de antibiyogram sonuçlarına göre hala kullanılabilir olması umut vericidir (30). Tigesiklin, ciddi MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanıma giren yeni bir ajandır. Daptomisin, pulmoner sürfaktanlar tarafından inaktive edildiği için toplum kökenli pnömonilerde kullanılmamalıdır (31).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında klindamisin ve vankomisin kombinasyonu bir alternatif olarak ele alınmaktadır (32).

Metisilin direncinin saptanması amacıyla; disk difüzyon, E-test, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, oksasilin içeren katı besiyerlerinin kullanıldığı tarama testleri ve mecA geni veya onun ürünü olan PBP2a'nın tesbit edilmesine dayalı çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. PCR ile mecA geni varlığının tespit edilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (20). CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin diski ile mecA aracılı oksasilin direncinin gösterilebileceği bildirilmiştir (33). Özel ve ark. (20) göre *S. aureus* için sefoksitin ve oksasilin disklerinin duyarlılığı birbirine eşit iken (%94,3), KNS'ler için oksasilin daha duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda sefoksitine direnç %66,6 saptanmıştır. Ayrıca CLSI önerilerine göre antibiyotik disklerinin dizilimi yapılırken eritromisin ve klindamisin diskleri yan yana konularak eritromisine bakan yüzünde düzleşme olması (D-zonu) indüklenebilir MLS tipi direnç açısından araştırılabilir (33).

Vural ve ark. (33) sefoksitin disk difüzyon yönteminin mecA dışı dirençleri atlama olasılığı göz önüne alınarak, laboratuvarlarda sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon yöntemlerinden ikisinin de çalışılması MRSA direncini yakalamada daha faydalı olabileceğini düşünmektedirler.

Sonuç olarak çalışmamızda, yoğun bakım ünitelerinin yeni uygulamaya girmesi ve kliniklerden de hastane kökenli MRSA'ların yeterli düzeyde saptanamaması, daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu ve metisilin direncini belirlemede, geliştirilmiş farklı yöntemlerin kullanılmasına gerek olduğunu göstermektedir. Buna rağmen izole edilen MRSA ve MRCNS'lerin toplumda yüksek düzeyde bulunması ve çeşitli antibiyotiklere dirençli bulunmaları akılcı antibiyotik kullanımını tekrar gündeme getirmektedir. Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre kararlaştırılacak ilaç tedavisinin direnç gelişimini önlemede önemli olduğunu düşünüyoruz. Ayrıca toplum kökenli MRSA izolatlarının varlığının kanıtlanabilmesi için SCCmec tipi ve PVL saptanması gibi ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Çetinkaya ŞY. Metisilin dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane İnfek Derg, 2000; 4: 205-17.
2. Cengiz AT. Staphylococcus. Ustaçelebi Ş, Ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 339-47.
3. Eliopoulos G:Antimicrobial agents for treatments of serious infections caused by *S. aureus* and enterococci. Eur J Clin Microbial Infect Dis, 2005; 24(12): 826-31.
4. Ünal S. MRSA problemi, ANKEM Derg, 2009; 23(EK 2): 1-12.
5. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. St. Louis: Mosby, 1994: 321-32.
6. Ertek M, Yazgı H, Erol S, Aktaş AE. Klinik örneklerden soyutlanan stafilocok kökenlerinin moksifloksasin ve diğer kinolonlara in vitro duyarlılığının araştırılması. İnfek Derg, 2004; 18: 199-203.
7. Kollef MH ve Micek ST. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new community-acquired pathogen? Curr Op Infect Dis, 2006, 19(2): 161-8.
8. Van Leeuwen WB, van Pelt C, Luijendik A, Verbrugh HA, Goessens WH. Rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by the MRSA screen latex agglutination test, J Clin Microbiol, 1999; 37(9): 3029-30.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement. Document M 100-S18, 2008. CLSI, Wayne, Pennsylvania.

10. Haley RW, Hightower AW, Khabbaz RF, Thornsberry C, Martone WJ, Alle JR: The emergence of methicillin resistant *S. aureus* infections in U.S.A. hospitals. *Ann Intern Med*, 1982; 97: 297-308.
11. Ryke CA, Lodise TP Jr, Rybak MJ, McKinnon PS. Epidemiology, treatment and outcomes of nosocomial bacteremic *S. aureus* pneumonia. *Chest*, 2005; 128(3): 1414-22.
12. Akpaka PE, Christian N, Bouda NC, Smikle MF. Epidemiology of coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical blood specimens at the university hospital of the West Indies. *West Indian Med J*, 2006; 55 (3): 170-3.
13. Cunha RS, Sinzato YK, Silveira VA. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004; 99(8): 855-60.
14. Pal N, Ayyagari A. Species identification and methicillin resistance of coagulase negative staphylococci from clinical specimens. *Indian J Med Res*, 1989; 89: 300-5.
15. Fleer A, Hemels MAC, Paauw A, Krediet TG. Reduced expression of PBP-2A by neonatal mecA-positive coagulase-negative staphylococci (CoNS) blood isolates: B-lactams are useful first-line agents for the treatment of neonatal CoNS sepsis, restricting the use of vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 2012; 67(7): 1616-8.
16. Moellering RC Jr. Current treatment options for community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* infection. *Clin Infect Dis*, 2008; 46: 1032-7.
17. Özgüven A, Tünger Ö, Çetin ÇB, Dinç G. İlköğretim ve lise öğrencilerinde toplum kökenli metisiline dirençli *S. aureus* burun taşıyıcılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2008; 42: 661-7.
18. Çıtak S, Karaçocuk E. Hastane ve toplum kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı. *C.Ü.Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004; 26(1): 13-7.
19. Duman Y, Tekerekoğlu MS, Otlu B. Toplum ve hastane kökenli *S. aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentine Lökosidin varlığının ve klonal ilişkisinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2013; 47(3): 389-400.
20. Özel G, Aslan V, Erdem GB, Çağatay M, Şencan İ, Mert A. Stafilocoklarda metisilin duyarlılığının belirlenmesinde oksasilin, sefoksitin, seftizoksim ve moksalaktam disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2011; 45(2): 258-65.
21. Opuş A, Keşli R, Kurtoğlu MG, Güzelant A, Uysal EB. Metisiline dirençli stafilocok suşlarında tigesiklin etkinliğinin araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 2012; 69(39): 121-6.
22. Vural A, Afşar İ, Kurultay N, Demirci M. *Staphylococcus aureus*'da metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodifüzyon ve PBP2a lateks aglutinasyon testlerinin karşılaştırılması *ANKEM Derg*, 2011; 25(3): 145-9.
23. Kallen AJ, Brunkard J, Moore Z, Budge P, Arnold KE, Fosheim G et al. *S. aureus* community-acquired pneumonia during the 2006 to 2007 influenza season. *Ann Emerg Med*, 2009; 53(3): 358-65.
24. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J et al. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA): Burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill*, 2010; 15(41): 19688.
25. Değerti K, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Sezgin C, Kurutepe S. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları. *İnfek Derg*, 2000; 14: 87-90.
26. Sancak B, Günalp A. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli *S.aureus* izolatlarının mupirosin ve diğer antibiyotiklere olan duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul*, 2000; 34: 209-13.
27. Azap A, Ergin Timurkaynak F, Kuru İnci E, Arslan H. *S. aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *İnfek Derg*, 2003; 17: 289-91.
28. Ekşi F, Balcı İ, Gayyurhan ED, Çekem G, Klinik örneklerden soyutlanan *S. aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *İnfek Derg*, 2007; 21(1): 27-31.
29. Güler İ, Kılıç H, Atalay MA, Perçin D, Erçal BD. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *Dicle Tıp Dergisi*, 2011; 38 (4): 466-470.
30. Weigelt J, Kaafarani HM, Itani KM, Swanson RN. Linezolid eradicates MRSA better than vancomycin from surgical-site infections. *Am J Surg*, 2004; 188(6): 760-6.
31. Silverman JA, Mortin LI, Vanpraagh AD, Li T, Alder J. Inhibition of daptomycin by pulmonary surfactant: in vitro modeling and clinical impact. *J Infect Dis*, 2005; 191: 2149-52.

32. Wunderink RG, Rello J, Cammarata SK, Croos-Dabrera RV, Kollef MH. Linezolid ve vancomycin: analysis of two double-blind studies of patients with methicillin-resistant *S. aureus* nosocomial pneumonia. *Chest*, 2003; 124: 1789-97.

33. Vural A, Afşar İ, Kurultay N, Demirci M. *S. aureus*'da metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon ve PBP2a lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırılması. *ANKEM Derg*, 2011; 25(3): 145-9.

Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi *

Determination of microbiological characteristics of several kinds of ready-to-eat meals presented for consumption

Şule ŞENSES-ERGÜL¹, Havva SARI¹, Sevinç ERTAŞ¹,
Umut BERBEROĞLU¹, Yıldırım CESARETLİ¹, Hasan IRMAK²

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi ve gıda zehirlenmeleri açısından taşıdıkları riskin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Tüketime sunulan toplam 666 hazır yemek ürünü incelenmiştir. Bu gıdalar Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde yer alan; *Salmonella* spp. (TS EN ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (TS EN ISO 11290-1), *Escherichia coli* O157 (TS EN ISO 16654), termotoleran *Campylobacter* spp. (TS EN ISO 10272), *Bacillus cereus* (TS EN ISO 7932), koagülaz pozitif stafilocoklar (TS EN ISO 6888-1), sülfite indirgeyen anaerob bakteri (ISO 15253), *E. coli* (Bacteriological Analytical Manual), küf ve maya (TS EN ISO 21527-1 ve 21527-2), stafilkokal enterotoksin (3M Tecra) parametreleri açısından incelemeye alınmışlardır.

Bulgular: İncelemeye alınan hazır yemek örneklerinden 612 adedi (%92) Yönetmelik'te yer alan gıda güvenilirliği ve patojen mikroorganizma limitleri açısından tüketime uygun bulunurken, 54 adedinin (%8) bir veya daha fazla parametre yönünden tüketime uygun olmadıkları belirlenmiştir. Çalışmada, örneklerin hiçbirinde *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 ve termotoleran *Campylobacter* spp. tespit

ABSTRACT

Objective: In this study, determination of microbiological quality of several kinds of ready-to-eat meals and their risk in means of foodborne infections, were aimed.

Method: Total of 666 ready-to-eat meals available for consumption, were examined. These products were examined in means of the parameters; *Salmonella* spp. (TS EN ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (TS EN ISO 11290-1), *Escherichia coli* O157 (TS EN ISO 16654), thermotolerant *Campylobacter* spp. (TS EN ISO 10272), *Bacillus cereus* (TS EN ISO 7932), coagulase positive staphylococci (TS EN ISO 6888-1), sulfite reducing anaerobic bacteria (ISO 15253), *E. coli* (Bacteriological Analytical Manual), molds-yeasts (TS EN ISO 21527-1 ve 21527-2) and staphylococcal enterotoxin (3M Tecra) parametres as it was stated in Regulation on Microbiological Criteria for Foods.

Results: 612 (92%) of the investigated ready-to-eat meals were found in accordance with the food safety criteria and limits of pathogenic microorganisms mentioned in the Regulation, while 54 of them (8%) were found unsuitable for consumption. In none of the samples *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 and thermotolerant *Campylobacter* spp. were

* Bu çalışma; 4. Gıda Güvenliği Kongresi'nde (14-15 Mayıs 2013, İstanbul-TÜRKİYE) poster bildiri olarak sunulmuştur.

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici ve Çalışan Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı, ANKARA
² Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici ve Çalışan Güvenliği Laboratuvarları Başkan Yardımcılığı, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Şule ŞENSES-ERGÜL

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici ve Çalışan Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı, ANKARA

Tel : +090 312 565 51 52

E-posta / E-mail : sule.senses@saglik.gov.tr

Geliş Tarihi / Received : 24.07.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 16.04.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.81994

Şenses-Ergül Ş, Sarı H, Ertaş S, Berberoğlu U, Cesaretlı Y, İrmak H. Tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 199-208.

edilmemiştir. Hazır yemek ürünlerinden 30 adedinin *B. cereus* (1×10^3 - $5,7 \times 10^4$ kob/g), 14 adedinin *E. coli* ($1,5 \times 10^1$ - $>1,1 \times 10^3$ EMS/g), beş adedinin sülfid indirgeyen anaerob bakteri ($1,6 \times 10^3$ - $>3 \times 10^4$ kob/g), bir adedinin koagülaz pozitif stafilkok (4×10^3 kob/g) ve bir adedinin de toplam küf-maya ($2,6 \times 10^4$ kob/g) parametreleri yönünden Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde belirtilen limitlere uygun olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca altı adet hazır yemek ürünüde stafilkokkal enterotoksin bulunmuştur.

Sonuç: Elde edilen bulgulara göre incelemeye alınan tüketime hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitelerinin genellikle (%92) yeterli olduğu saptanmıştır. Tüketime uygun olmadıkları belirlenen hazır yemeklerin ise uygunsuz buldukları parametrelerin yemek türüne bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Çalışmamızda, tüketime sunulan ve ısıtılarak servis edilen hazır yemek ürünlerinin özellikle *B. cereus*, stafilkokkal enterotoksin ve sülfid indirgeyen anaerob bakteri parametreleri, soğuk olarak servis edilen salata, meze gibi ürünler ile üretim sırasında elle temasta bulunan pişirilmiş unlu mamullerin ise *E. coli* ve koagülaz pozitif stafilkok parametreleri açısından risk taşıdıkları sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gıda, gıda kaynaklı enfeksiyon, patojen bakteri, mikrobiyoloji, hijyen

not detected. In the study, number of the ready-to-eat meals which were not complying the limits specified in the regulations in terms of *B. cereus* (1×10^3 - 5.7×10^4 cfu/g) was 30. The number of ready to eat meals which were above limits for *E. coli* (1.5×10^1 - $>1.1 \times 10^3$ MPN/g), staphylococcal enterotoxin and sulphite reducing anaerobic bacteria (1.6×10^3 - $>3 \times 10^4$ cfu/g), were found as; 14, 6 and 5, respectively. While one sample was found unsuitable for consumption in means of coagulase positive staphylococci (4×10^3 cfu/g), another sample was found unsuitable for consumption in means of total mold and yeast counts (2.6×10^4 cfu/g).

Conclusion: According to the data obtained in this study, microbiological quality of the ready-to-eat meals were found mostly good. The meals which were found unsuitable for consumption in means of the parameters not complying the limits showed differences depending on the kind of the food sample. In this study, it was found that ready-to-eat meals served after reheating carry risk in means of *B. cereus*, staphylococcal enterotoxin and sulphite reducing anaerobic bacteria parameters. Additionally, cold meals like salads, appetizers and cooked bakery products were found to carry risk in terms of the parameters; *E. coli* and coagulase positive staphylococci.

Key Words: Food, foodborne infection, pathogenic bacteria, microbiology, hygiene

GİRİŞ

Gıda kaynaklı zehirlenmelere neden olan patojen mikroorganizmaların hastalığa neden olma mekanizmaları, bu mikroorganizmaların gıdalardaki kontrolü üzerinde birçok çalışma ve düzenleme yapılmış ancak tüm önlemlere rağmen teknolojik olarak gelişmiş batı ülkelerinde bile gıda kaynaklı salgınlara rastlanabilmektedir (1). İnsanların sağlıklarını koruyabilmeleri için yeterli ve dengeli beslenmelerinin yanı sıra tükettikleri gıdaların insan sağlığını tehdit etmemesi ve güvenli olması da gerekmektedir (2, 3). Endüstrileşme ile beraber hazır yemek ile beslenmeye karşı eğilimin son yıllarda

artış gösterdiği görülmektedir. ABD, İngiltere ve Hollanda'da elde edilen istatistiksel verilere göre gıda kaynaklı hastalıkların %70'inden fazlası yemek veya servis hizmeti veren sektörlerle ilişkilendirilmektedir (4). Gıda zehirlenmesi; kontamine gıda ve/veya suyun tüketilmesi sonucu ortaya çıkan hastalıklara verilen genel bir isimdir. (5) Günümüzde gıda kaynaklı zehirlenmeler birçok ülkenin önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıda maddelerinin hijyenik koşullarda üretilerek, hijyen zinciri bozulmadan tüketiminin sağlanması sağlıklı beslenmenin sağlanabilmesi için önemli bir kriterdir.

Gıdalar üretim aşamasından tüketiciye ulaşıncaya kadar yapılan işlemler zincirinde çeşitli kaynaklardan bulaşan mikroorganizmalar, uygun koşullar söz konusu ise hızla çoğalarak duyuşal kalitenin bozulmasına, ekonomik kayıplara ve gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedirler (6, 7). Bu süreçte hijyen zincirinin en önemli basamaklarından birini personel hijyeni oluşturmaktadır. Ayrıca gıdaların üretim ve işlenmesi aşamalarında kullanılan kesme tahtaları, dilimleyici, karıştırıcı ve öğütücüler, işletme suyu, ortam havası ile üretim koşullarında bulunmaması gereken çöpler, haşereler, kemiriciler ve ev hayvanları bulaşma kaynakları olarak karşımıza çıkmaktadır (6).

Gıda satış noktalarında satışa sunulan ve hemen tüketilebilecek halde bulunan ürünler, tüketime hazır yiyecekler/gıdalar olarak adlandırılmaktadırlar (8, 9). Bu gıdalar; çiğ ya da pişmiş, sıcak veya soğuk, ya da yeniden ısıtma gibi bir ısı işlem olmadan tüketilebilir halde bulunmaktadırlar (8). Tüketime hazır gıdalar, doğrudan tüketildiği için pişirilerek içerisindeki mikroorganizmaların çoğu öldürülebilir gıdalara göre tüketici sağlığı açısından daha risklidirler. Bu gıdalar çoğunlukla tüketilinceye kadar soğukta muhafaza edilerek çoğu bakterinin inhibisyonu sağlanmaktadır (10). Yapılan birçok çalışmada tüketime hazır gıdalardan izole edilen patojen mikroorganizmalar arasında verositotoksin üreten *Escherichia coli* (VTEC), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *Campylobacter* spp. türlerinin yer aldıkları bildirilmektedir (8, 11). Birçok ülkede birinci sıradaki gıda kaynaklı hastalık etmenlerinin *Salmonella* ve *Campylobacter* türleri olduğu belirtilmektedir. Ancak ülkeler arasında insanların beslenme alışkanlıklarından ileri gelen farklılaşmalar olduğu da vurgulanmaktadır. (12). Tüketime hazır gıdalar aracılığı ile meydana gelen gıda kaynaklı salgınlardaki patojen etkenlerin incelendiği birçok çalışma mevcuttur (8, 10, 11).

Gıdaların mikrobiyolojik yönden güvenli olmaması küresel bir sorun olmaya devam etmektedir. Bütün dünyada ülkeleri gıda kaynaklı hastalıklardaki artışa

yanıt olarak gıda güvenilirliğinin geliştirilmesi amacıyla yeni önlemler alabilmek için çalışmalar yapmaktadırlar. Tarım ve gıda alanında çalışan gıda üreticilerinin “Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi” oluşturabilmeleri için ülkelerin yönetmeliklerinde çeşitli düzenlemeler yapılmakta ve bu şekilde gıda kaynaklı salgınlara önlenmesi hedeflenmektedir (13). Ülkemizde de bu amaçla gerçekleştirilen en son düzenleme, T. C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından hazırlanan ve 29.12.2011 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (14)’nin yürürlüğe girmesidir.

Bu çalışmanın amacı, tüketime sunulan çeşitli hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi ve gıda zehirlenmeleri açısından taşıdıkları riskin belirlenmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Merkez Tüketici Ürünleri Mikrobiyolojik Araştırma Laboratuvarlarına Ocak-Aralık 2012 tarihleri arasında mikrobiyolojik analiz amacıyla farklı illerden gelen toplam 666 adet hazır yemek ürünü, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği’nde (14) yer alan parametreler açısından incelenmiştir. Steril kaplara alınan gıda örnekleri, örnek alınımı takiben 24 saat içerisinde soğuk zincirde laboratuvara ulaştırılmıştır. Gıda örneklerinin 587 tanesi kontrol, 79 tanesi ise zehirlenme/şikayet nedeniyle incelemeye alınmıştır. Analize alınan hazır yemek ürünlerinin 519 adedi tüketime hazır et ve sebze yemeği, 58 adedi tüketime hazır şarküteri ürünü, 42 adedi tüketime hazır unlu mamul, 36 adedi tüketime hazır sütlü ve şerbetli tatlı, 11 adedi diğer gıdalar grubu olmak üzere beş ana başlık altında gruplandırılarak analiz edilmiştir.

Çalışmamızda incelenen gıda örnekleri, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Ek 1 ve Ek 3’teki gruplandırılmalar dikkate alınarak *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Bacillus*

cereus, koagülaz pozitif stafilkoklar, *E. coli* O157, termotoleran *Campylobacter* spp., sülfid indirgeyen anaerob bakteri, *E. coli*, küf ve maya, stafilkokkal enterotoksin parametreleri açısından analiz edilmiştir (14). Laboratuvarımıza kontrol amacıyla gelen gıdalarda Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği Ek 1'de yer alan gıda güvenilirliği kriterlerine bakılırken, zehirlenme ve/veya şikayet amacıyla gelen gıdalar Ek 1'deki parametrelerin yanı sıra Ek 3'te yer alan patojen mikroorganizmalar açısından da incelemeye alınmışlardır.

Salmonella spp. tespiti amacıyla TS EN ISO 6579 (15) yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla 25 g gıda numunesi 225 ml tamponlanmış peptonlu su (TPS, LabM) içerisinde homojenize edildikten sonra 37 °C'de 18-24 sa ön zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda TPS'deki kültürden 0,1 mL alınarak seçici zenginleştirme işlemi için Rappaport Vasiliadis Broth (RVS, Difco) besiyerine aktarılmıştır. RVS Broth besiyerinde 41,5 °C'de 24 sa inkübe edilerek oluşturulan kültürden bir öze dolusu alınarak Xylose Lysine Deoxycholate (XLD, LabM) Agar besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekimler gerçekleştirilmiştir. Katı besiyerinde oluşan siyah merkezli renksiz koloniler şüpheli *Salmonella* spp. olarak değerlendirilmiş ve bu kolonilerden beş adet seçilerek biyokimyasal (oksidaz, laktoz/ glukoz fermantasyonu, üre hidrolizi, H₂S oluşumu, sitrat kullanımı, L-lizin dekarboksilaz aktivitesi), serolojik (OMA ve OMB, THSK, Biyolojik Ürünler Araştırma ve Geliştirme Daire Başkanlığı) doğrulama testleri ile Enteropluri tanımlama kiti (Liofilchem) uygulanmıştır.

L. monocytogenes tespitinde ise ISO 11290-1 (16) yöntemine göre 25 g gıda numunesi 225 mL Half Fraser Broth (LabM) besiyerinde homojenize edildikten sonra 30 °C'de 24 sa ön zenginleştirme işlemi uygulanmıştır. Bu işlemden sonra Half Fraser Broth besiyerinde oluşan kültürden 0,1 mL alınarak Fraser Broth besiyerine aktarılmış ve 36 °C'de 24 sa seçici zenginleştirme yapılmıştır. Tipik *L. monocytogenes* kolonilerinin gözlemlenmesi için Oxford Agar (LabM)

besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekimler gerçekleştirilmiştir. Oxford Agar besiyerinde 36 °C'de 48 sa inkübasyon sonunda gelişen 2 mm çaplı, grimsi yeşil renkli merkezleri çökük, çevresi siyah hale ile çevrili koloniler doğrulama için seçilmiştir. Doğrulama amacıyla biyokimyasal (katalaz, Gram boyama, hareket deneyi, hemoliz, CAMP, karbonhidrat testleri) ve serolojik testler ile *L. monocytogenes* tanımlama kiti (Microbact) yapılmıştır.

B. cereus tespiti ve sayımı için ISO 7932 (17) yöntemi kullanılmış ve en az 10 g gıda örneğinin TPS içerisinde 1/10'luk seyreltisi hazırlanarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan hemen sonra Mannitol Yolk Polymyxin Agar (MYP, Oxoid) besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekimler gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan Petri kutuları 30 °C'de 48 sa inkübe edildikten sonra, lesitinaz aktivitesine bağlı olarak opak zonla çevrelenmiş ya da düşük lesitinaz aktivitesi nedeni ile opak zonla çevrelenmemiş tüm pembe koloniler sayılmış, bu kolonilerden beş tanesine doğrulama amacı ile kanlı agar besiyerinde hemoliz testi ve Gram boyama ile mikroskopik inceleme yapılmıştır.

Koagülaz pozitif stafilkokların tespiti ve sayımı amacıyla ISO 6888-1 (18) yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla en az 10 g tartılan gıda numunesi TPS içerisinde homojenize edilmiş ve Baird Parker Agar (BPA, Difco) besiyerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan Petri kutuları 37 °C'de 48 sa inkübe edilmiştir. Tipik ve atipik kolonileri doğrulama amacı ile Gram boyama ve koagülaz testi yapılmıştır.

Termotoleran *Campylobacter* spp. tespiti ISO 10272-1 (19) yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. 25 g gıda örneği 225 mL Bolton broth (Merck) besiyerinde homojenize edildikten sonra öncelikle 37 °C'de 4-6 sa, daha sonra 41,5 °C'de 48 sa mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiştir. Zenginleştirme ortamından alınan bir öze dolusu kültür Karmali Agar (Oxoid) besiyerine ekilmiştir. Petri kutuları 41,5 °C'de 48 sa mikroaerofilik koşullarda inkübe edilmiştir. Şüpheli *Campylobacter* kolonilerine mikroskopik morfoloji ve hareket incelemesi, oksidaz

testi, 25 °C'de mikroaerofilik ve 41,5 °C'de aerobik koşullarda üreme testleri uygulanmıştır.

E. coli O157 tespitinde ISO 16654 (20) yöntemine göre 25 g gıda örneğine 225 mL novobiyosin içeren modifiye Tryptic Soy Broth besiyerinde (mTSB+N, Merck) zenginleştirme işlemi yapılmıştır. 41,5 °C'de 18-36 sa inkübasyon sonunda immünomanyetik seperasyon (IMS, LabM) uygulanmış ve sefiksim tellürit içeren sorbitol MacConkey (CT-SMAC, Oxoid) Agar besiyerine ekimler gerçekleştirilmiştir. CT-SMAC besiyerinde 37 °C'de 24 sa inkübasyon sonucu gelişen 1 mm çaplı, şeffaf, açık sarımsı-kahverengi görünümlü koloniler, şüpheli *E. coli* O157 kolonileri olarak değerlendirilmiştir. Şüpheli kolonilere indol ve serolojik doğrulama testleri uygulanmıştır.

Sülfid indirgeyen anaerop bakteri tespiti ve sayımı, ISO 15283 (21) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla en az 10 g gıda numunesinin TPS ortamında homojenize edilerek Demir Sülfid Agar (Scharlau) besiyerine çift katlı dökme plak yöntemi ile 37 °C'de 48 sa anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda besiyerinde gelişen siyah renkli, etraflarında siyah zon olan koloniler sülfid indirgeyen anaerobik bakteri olarak sayılmıştır.

E. coli tespiti ve sayımı ise Bacteriological Analytical Manual (22) tarafından önerilen en muhtemel sayı (EMS) yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada, küf ve maya sayımı amacıyla ISO 21527-1 (23) ve 21527-2 (24) yöntemleri kullanılmıştır. Su aktivitesi değeri 0,95 ve daha yüksek olanlar için Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC, LabM), 0,95'ten düşük olanlar için Dichloran Glycerol %18 Agar (DG18, Oxoid) besiyerleri kullanılmıştır. 25 °C'de 3-5 günlük inkübasyon sonunda gelişen koloniler mikroskopik olarak incelenerek toplam küf ve maya sayımları yapılmıştır.

Stafilokokal enterotoksin tespitinde, 3M Tecra marka test kiti kullanılmış ve tüm aşamalar kit ile birlikte sağlanan kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Araştırma bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla ki-kare testi uygulanmıştır.

BULGULAR

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Tüketici Güvenliği Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Merkez Tüketici Ürünleri Mikrobiyolojik Araştırma Laboratuvarlarında 1 Ocak - 31 Aralık 2012 tarihleri arasında mikrobiyolojik olarak incelemeye alınan toplam 666 adet tüketime hazır yemek ürününün analize geliş amacına göre dağılımları ve tüketime uygunluk durumları Tablo 1'de gösterilmiştir. İncelenen gıdalardan 587 adedi kontrol, 79 adedi ise zehirlenme/şikayet nedeniyle analize alınmıştır. Mikrobiyolojik olarak incelenen gıda örneklerinden 612 adedi (%92) Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne göre tüketime uygun bulunurken, 54 adedinin (%8) tüketime uygun olmadıkları tespit edilmiştir. Zehirlenme/şikayet amacıyla gelen numuneler ile kontrol amacıyla gelen numuneler arasında ki-kare testi uygulandığında (ki-kare: 25,9, p<0,05); istatistiksel anlamda uygunsuzluk en çok zehirlenme/şikayet nedeniyle gelen numunelerde görülmüştür. Tüketime uygun olmadıkları tespit edilen gıdaların 18 tanesi zehirlenme/şikayet, 36 tanesi ise kontrol amacıyla incelemeye alınmıştır.

Tablo 1. Hazır yemek ürünlerinin analize geliş amaçlarına göre dağılımı, THSK, 2012

Analize Geliş Amacı	Analiz Sonucu		Toplam
	Uygun	Uygun Değil	
Zehirlenme/ Şikayet	61	18	79
Kontrol	551	36	587
Toplam	612	54	666

Tüketime hazır gıda ürünlerinin Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne (14) göre gruplandırılması ve bu gruplardaki gıdaların tüketime uygunluk durumları Tablo 2'de verilmiştir. Tüketime

Tablo 2. Hazır yemek ürünlerinin gruplandırılması, THSK, 2012

Gıda Grubu	Hazır Yemek Ürünleri	Analiz Sonucu		Toplam
		Uygun	Uygun Değil	
1	Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü et ve sebze yemeği	488	31	519
2	Tüketime hazır her türlü salata, şarküteri ürünleri ve soğuk mezeler vb.	48	10	58
3	Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü unlu mamul (makarna, her türlü börek, lahmacun, pide, pizza, mantı vb.)	33	9	42
4	Şerbetli ve sütlü tatlılar	34	2	36
5	Diğer	9	2	11
Toplam		611	54	666

uygun olmadıkları belirlenen 54 hazır yemek ürününün 31 adedinin (%58) pişirilmiş et ve sebze yemekleri, 10 adedinin (%18) şarküteri ürünleri, dokuz adedinin (%16) pişirilmiş unlu mamuller, iki adedinin (%4) tatlı ve iki adedinin (%4) diğer gıdalar (peynir ve turşu) grubunda yer aldıkları belirlenmiştir.

Çalışmada, analize alınan 666 adet gıda örneğinin hiçbirinde *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 ve termotoleran *Campylobacter* spp. tespit edilmemiştir. Laboratuvarımıza zehirlenme/şikayet nedeniyle gelen ve yapılan analizler sonucunda tüketime uygun olmadıkları belirlenen 18 adet gıda örneğindeki uygun bulunmayan mikrobiyolojik parametrelerin gıda gruplarına göre dağılımı Tablo 3'te gösterilmiştir. Bu gıdalardan 12 adedinde *B. cereus*, beş adedinde sülfite indirgeyen anaerob bakteri, iki adedinde stafilkokal enterotoksin, bir adedinde *E. coli* ve bir adedinde de koagülaz pozitif stafilkokal parametresi yönünden uygunsuzluk tespit edilmiştir. *B. cereus* yönünden tüketime uygun bulunmayan numunelerin çoğunu et ve sebze yemeklerinin

Tablo 3. Zehirlenme amacıyla analize alınan ve tüketime uygun olmayan hazır yemek ürünlerindeki uygun olmayan mikrobiyolojik parametrelerin gıda gruplarına göre dağılımı, THSK, 2012

Gıda Grubu	Gıda Türü	Parametreler				
		<i>B. cereus</i>	Stafilkokal enterotoksin	<i>E. coli</i>	Sülfite indirgeyen anaerob bakteri	Koagülaz pozitif stafilkokal
Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü et ve sebze yemeği	Sebze yemeği	5	1	-	1	-
	Et yemeği	2	-	-	-	-
	Pilav	1	-	-	2	-
Tüketime hazır her türlü salata, şarküteri ürünleri ve soğuk mezeler vb.	Meze	1	-	-	1	-
Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü unlu mamul (makarna, her türlü börek, lahmacun, pide, pizza, mantı vb.)	Lahmacun	-	-	1	1	-
	Börek	1	-	-	-	-
	Pide	-	-	-	-	1
Diğer	Mantı	1	-	-	-	-
	Peynir	-	1	-	-	-
Toplam	Turşu	1	-	-	-	-
		12	2	1	5	1

oluşturduğu, bunları pilav, meze, börek mantı ve turşu numunelerinin takip ettiği belirlenmiştir. Bu gıdalardaki *B. cereus* yükünün $1,3 \times 10^3$ - $>3 \times 10^4$ kob/g arasında değiştiği görülmüştür. Zehirlenme/ şikayet nedeniyle analize alınan bir adet sebze yemeği ile bir adet peynir numunesinde, stafilokokal enterotoksin varlığı tespit edilmiştir. *E. coli* yönünden tüketime uygun bulunmayan bir adet lahmacun numunesindeki *E. coli* sayısının $1,1 \times 10^3$ olduğu saptanmıştır. Sülfite indirgeyen anaerob bakteri yönünden tüketime uygun bulunmayan beş adet gıdanın; sebze yemeği, pilav, meze ve lahmacun numuneleri olduğu görülmüş, bu gıdalardaki sülfite indirgeyen anaerob bakteri sayısının $1,6 \times 10^3$ - $>3 \times 10^4$ kob/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Zehirlenme/ şikayet nedeniyle analize alınan bir adet pide numunesinde 4×10^3 kob/g düzeyinde koagülaz pozitif stafilokok olduğu saptanmıştır.

Kontrol amacıyla yapılan mikrobiyolojik incelemeler sonucunda tüketime uygun bulunmayan 36 adet gıda numunesindeki uygun bulunmayan parametrelerin gıda gruplarına göre dağılımı Tablo 4'te özetlenmiştir. Kontrol nedeniyle incelemeye alınan gıda numunelerinde de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 ve termotoleran

Campylobacter spp. türlerine rastlanmamıştır. Bu numunelerden 18'inin *B. cereus*, 13'ünün *E. coli*, dört tanesinin stafilokokal enterotoksin ve bir tanesinin ise küf-maya parametreleri açısından ilgili Yönetmeliğe (14) uygun olmadıkları belirlenmiştir. Bu grupta yer alan ve *B. cereus* parametresi açısından uygun olmadıkları belirlenen numunelerin çoğunu (14 adet) et ve sebze yemekleri oluşturduğu, bunları makarna (2), pilav (1) ve meze (1) numunelerinin takip ettiği bulunmuştur. Tüketime uygun bulunmayan numunelerdeki *B. cereus* sayısının 1×10^3 - $5,7 \times 10^4$ kob/g arasında değiştiği saptanmıştır. *E. coli* açısından ilgili Yönetmeliğe uygun olmadıkları belirlenen numunelerin çoğunun salata (6 adet) numunesi olduğu, bunları makarna (3 adet) meze (2 adet), pide (1 adet) ve tatlı (1 adet) numunelerinin izlediği belirlenmiştir. Bu numunelerdeki *E. coli* yükünün $1,1 \times 10^1$ - $>1,1 \times 10^3$ kob/g arasında olduğu tespit edilmiştir. Stafilokokal enterotoksin parametresi yönünden uygun olmadıkları belirlenen numunelerin tümünün et ve sebze yemekleri gruplarında yer aldıkları saptanmıştır. Küf-maya parametresi yönünden tüketime uygun bulunmayan bir adet numunenin ise tatlı grubunda yer aldığı ve toplam küf-maya sayısının $2,6 \times 10^3$ kob/g olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. Kontrol amacıyla analize alınan ve tüketime uygun olmayan hazır yemek ürünlerindeki uygun olmayan mikrobiyolojik parametrelerin gıda gruplarına göre dağılımı

Gıda Grubu	Gıda Türü	Parametreler			
		<i>B. cereus</i>	Stafilokokal enterotoksin	<i>E. coli</i>	Küf-maya
Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü et ve sebze yemeği	Sebze yemeği	5	3	-	-
	Et yemeği	9	1	-	-
	Pilav	1	-	-	-
Tüketime hazır her türlü salata, şarküteri ürünleri ve soğuk mezeler vb.	Meze	1	-	2	-
	Salata	-	-	6	-
Tüketime hazır (pişirilmiş) her türlü unlu mamul (makarna, her türlü börek, lahmacun, pide, pizza, mantı vb.)	Pide	-	-	1	-
	Makarna	2	-	3	-
Diğer	Tatlı	-	-	1	1
Toplam		18	4	13	1

TARTIŞMA

Elde edilen bulgulara göre farklı yerlerde tüketime sunulan hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitelerinin (%92) iyi olduğu belirlenmiştir. Tüketime uygun bulunmayan ürünlere (%8) görülen bakteriyal üremelerin gıdanın türüne bağlı olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmada, hazır yemek ürünlerinin özellikle et ve sebze yemekleri ile pilav türü gıdaların *B. cereus*, stafilkokal enterotoksin ve sülfid indirgeyen anaerob bakteri parametreleri açısından risk taşıdıkları sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca incelenen gıdalarda *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 ve termotoleran *Campylobacter* spp. bulunmamıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda da elde ettiğimiz bulgulara benzer sonuçlara rastlanmış, tüketime hazır gıdalarda özellikle *Salmonella* spp, *E. coli* O157, *L. monocytogenes* ve *Campylobacter* spp. rastlanma sıklığının oldukça düşük olduğu görülmüştür (10, 11).

Yalçın ve Can (25) tarafından yapılan bir çalışmada, 100 adet tüketime hazır et yemeği *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *B. cereus* parametreleri yönünden incelenmiş, çalışmamızla benzer şekilde bu gıdalardan hiç birinde *Salmonella* spp. varlığına rastlanmadığı rapor edilmiştir. Söz konusu çalışmada incelenen gıda örneklerinden sekiz tanesinde *S. aureus* (1×10^2 - 4×10^2 kob/g), yedi tanesinde *B. cereus* (1×10^2 - 3×10^2 kob/g) ve altı tanesinde ise *E. coli*'nin (1×10^2 - 2×10^2 kob/g) bulunduğu belirtilmiştir. Bu gıdalardan sadece *E. coli* gelişimi tespit edilenlerin ilgili Yönetmelik'teki kriterlere uygun olmadıkları bildirilmiş, *S. aureus* tespit edilen gıdalarda enterotoksin testi yapılmamıştır.

Bir başka çalışmada ise piyasada satılan 30 adet tüketime hazır dönerin mikrobiyolojik özellikleri incelenmiştir (26). Yapılan incelemeler sonucunda döner örneklerinde *S. aureus* ve sülfid indirgeyen anaerob bakteri gelişimine rastlanmazken, aynı örneklerdeki toplam aerobik mezofilik bakteri sayısının çoğunlukla 10^3 - 10^4 kob/g arasında değiştiği, bazı örneklerde 10^6 kob/g düzeyine ulaştığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada döner örneklerinin %36,6'sı Enterobacteriaceae, %56,6'sı ise; *E. coli*

açısından negatif bulunmuştur. Enterobacteriaceae ve *E. coli* gelişen örneklerde sayıların sırasıyla, 10^4 ve 10^3 kob/g olduğu belirtilmiştir. Her iki çalışma da, pişirilerek tüketime sunulan gıdalar olmasına rağmen et yemeklerinin düşük hijyen uygulamaları nedeniyle sağlık riski oluşturabileceklerini göstermektedir (25, 26).

Hatakka (27); 1989-1994 yılları arasında uçak yolculukları sırasında servis edilen sıcak ve soğuk yemeklerin mikrobiyolojik kalitelerinin incelendiği bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışmanın sonucunda; incelenen yemeklerde *Clostridium perfringens*'e rastlanmazken, sıcak servis edilen yemeklerde *Salmonella* spp. bulunma oranı %0,3, soğuk servis edilen yemeklerde ise %0,1 bulunmuştur. Sıcak yemeklerde *E. coli* bulunma oranı %8,2, soğuk yemeklerde ise; %14 rapor edilmiştir. *S. aureus*'a sıcak yemeklerde %0,6, soğuk yemeklerde ise; %7 oranında rastlanıldığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra, *B. cereus* bulunma oranı sıcak yemeklerde %0,7, soğuk yemeklerde ise %3 olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde ise uçakta yeniden ısıtılarak sıcak servis edilen yemek numunelerindeki mikrobiyal riskin, soğuk servis edilenlere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda incelenen tüketime hazır gıdalardan et ve sebze yemekleri ile pilav ve makarna örnekleri sıcak, meze, salata vb. ürünler ise soğuk servis edilen gıdalar olarak kabul edilebilir. Bu şekilde yapılan bir gruplandırma ile sıcak servis yapılan gıda örneklerinde Yönetmelik'teki (14) limit değerlerin üzerinde *B. cereus*'a, soğuk servis yapılan gıdalarda ise limit değerlerin üzerinde *E. coli* varlığına rastlanabildiğini söyleyebiliriz.

Tüketime hazır salataların mikrobiyolojik kalitelerinin incelendiği bir başka çalışmada ise örneklerin %55,1'inde toplam aerobik mezofilik bakteri, %54'ünde Enterobacteriaceae, %13'ünde *S. aureus*, %61,3'ünde maya ve %9,5'inde küf gelişimi tespit edilmiştir (28).

Arcı ve ark. (29) tarafından yapılan bir çalışmada, incelenen hazır salatalardaki toplam canlı bakteri sayısının 5×10^5 - 2×10^9 kob/g arasında olduğu, maya

ve küf sayısının 10^2 - 3×10^6 kob/g arasında değiştiği ve laktik asit bakterilerinin sayısının 3×10^2 - $1,1 \times 10^7$ kob/g arasında olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada örneklerin çoğunda koliform grubu bakteri ve *E. coli*'ye rastlanıldığı ve sayılarının sırasıyla, 10^2 - $9,2 \times 10^6$ kob/g ile 25 - 10^4 kob/g olarak bulunduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada hazır salata örneklerindeki *S. aureus* sayısının 12 - $2,8 \times 10^3$ kob/g arasında değiştiği bulunmuştur (29).

Tüketime hazır farklı çeşitteki gıdaların incelendiği bir başka çalışmada, örneklerde koagülaz pozitif stafilokoka rastlanmadığı, sadece bir adet salata numunesinde *Salmonella* spp. izole edildiği ve örneklerin %18,5'inde *E. coli* saptandığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada *E. coli* tespit edilme oranının en yüksek olduğu gıdaların salatalar, yan ürünler (kızartma, zeytinyağlı yemek vb.) ve tatlılar olduğu, bunları et yemeklerinin izlediği ifade edilmiştir (30).

Can ve Yalçın (31) tarafından yapılan bir çalışmada; 50 adet yaş pasta örneği mikrobiyolojik olarak incelemeye alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda numunelerde *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* varlığına rastlanmadığı rapor edilmiştir. İncelenen yaş pasta örneklerinden beş tanesinin koagülaz pozitif stafilokoklar açısından pozitif sonuç verdiği ve bu örneklerdeki koagülaz pozitif stafilokok sayısının $1,1 \times 10^3$ - 4×10^4 kob/g arasında değiştiği bildirilmiştir. Yaş pasta örneklerinden dört tanesinde ise *E. coli* tespit edildiği, mikroorganizma sayısının 9-21 kob/g arasında değiştiği bildirilmiştir.

Çalışmamızda kontrol amacıyla incelenen iki adet tatlı numunesinden bir tanesinin *E. coli*, diğerinin

ise küf-maya parametresi açısından tüketime uygun olmadıkları belirlenmiştir. Bunun yanı sıra tüketime hazır salata, meze ve pişirilmiş unlu mamullerde, özellikle makarna, pide, lahmacun gibi ürünlerde gözlenen mevzuat limitleri üzerindeki *E. coli* varlığı da üretim koşullarındaki hijyen uygulamalarının yetersiz olduğunu göstermektedir.

Tüketime hazır gıdalarda zehirlenmeye/hastalığa neden olabilecek gıda kaynaklı etkenlerin bulunması tüketici sağlığı açısından önemli bir risk oluşturmaktadır. Gıda kaynaklı patojen mikroorganizmaların tespiti, mikroorganizma düzeyi ne olursa olsun önem taşımaktadır. Bu nedenle tüketiciler için taşıdığı risk ve kontaminasyon düzeyi ile ilgili önlemler alınmalıdır. Koagülaz pozitif stafilokoklar, *C. perfringens*, *B. cereus* gibi patojenlerin tüketime hazır gıdalarda düşük düzeyde bulunması sağlıklı bireyler için düşük risk oluştururken, bağışıklık sistemi zayıf olanlarda daha önemli sağlık problemlerine neden olabileceği bilinmektedir (11). Gıdalarda bulunabilecek düşük miktardaki mikroorganizma sayısı bu gıdaların üretiminde kullanılan hammaddelerin doğal yollarla kontaminasyonundan kaynaklanabileceği gibi çoğunlukla üretim veya işleme sırasındaki hatalardan kaynaklanabilmekte ve sağlık açısından taşıdıkları risk kabul edilemeyecek kadar artmaktadır. Bu çalışmada, incelenen tüketime hazır yemek ürünlerinin mikrobiyolojik kalitelerinin genelde iyi olduğu saptanmıştır. Bunun yanısıra uygunsuz saklama ve üretim koşullarına bağlı olarak bazı gıda numunelerinde de benzer ulusal ve uluslararası çalışmalarda da karşımıza çıkan bakteri türlerinin geliştikleri görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Gürgün V, Ayhan K. Gıdalar ve mikrobiyolojik riskler II. Gıda, 1996; 21(3): 159-164.
2. Çolak H, Ulusoy B, Bingöl B, Hampikyan H, Muratoğlu K. Tüketime sunulan bazı hazır yemeklerin mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. Turk Mikrobiyol Cem Derg, 2007; 37(4): 225-33.
3. Özkaya FD, Cömert M. Gıda zehirlenmelerinde etken faktörler. Turk Hij Den Biyol Derg, 2008; 65(3): 149-58.
4. Bilgin B, Erkan ÜC. Bir Hazır yemek işletmesinde HACCP sisteminin kurulması. Tekirdağ Zır Fak Derg, 2008; 5(3): 268-81.

5. Küçükçetin A, Milci S. *Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. *Gıda*, 2008; 33(3): 129-35.
6. Fidan F, Ağaoglu S. Ağrı bölgesinde bulunan lokantaların hijyenik durumu üzerine araştırmalar. *YYÜ Vet Fak Derg*, 2004; 15(1-2): 107-14.
7. Afshin J, Reza Z, Saeid S. Microbiological study of cocktail sausage during shelf life. *Middle-East J Sci Res*, 2011; 7(6): 1056-1056.
8. Alyaaqoubi SJM, Sani NA, Abdullah A, Rahman RDA. Microbiological quality of selected ready-to-eat food at Hulu Langat district, Malaysia. *Prosiding Seminar Kimia Bersama UKM-ITB VIII 9-11 June 2009*, Pp. 422.
9. Oranusi US, Braide W. A study of microbial safety of ready-to-eat foods vended on highways: Onitsha-Owerri, South East Nigeria. *Int Res J Microbiol*, 2012; 3(2): 66-71.
10. Hosein A, Muñoz K, Sawh K, Adesiyun A. Microbial load and the prevalence of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in ready-to-eat products in Trinidad. *The Open Food Sci J*, 2008; 2: 23-8.
11. Anonymous. Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1259151921557. 31.12.2013.
12. Gürgün V, Ayhan K. Gıdalar ve mikrobiyolojik riskler I. *Gıda*; 1996; 21(1): 23-9.
13. Jacxsens L, Kussaga J, Luning PA, Van der Spiegel M, Devlieghere F, Uyttendaele M. A microbial assessment scheme to measure microbial performance of food safety management systems. *Int J Food Microbiol*, 2009; 134: 113-25.
14. Anonymous. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Ankara: T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2011.
15. Anonymous. Gıda ve hayvan yemlerinin-mikrobiyolojisi-Salmonella spp tespiti için yatay metot. TS EN ISO 6579, 2002.
16. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. TS ISO 11290-1, 1996.
17. Anonymous. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Bacillus cereus sayımı için yatay metot. 30 °C’de koloni sayım tekniği. TS EN ISO 7932, 2004.
18. Anonymous. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-Koagülaz pozitif stafilkokların (*Staphylococcus aureus* ve diğer türler) sayımı için yatay metot-bölüm 1: Baird-Parker agar besiyeri kullanarak. TS EN ISO 6888-1, 1999.
19. Anonymous. Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi-*Campylobacter* spp.’nin sayımı ve belirlenmesi için yatay metot-bölüm I: belirlenme yöntemi. TS EN ISO 10272-1, 2006.
20. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. TS EN ISO 16654, 2001.
21. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions. ISO 15213, 2003.
22. Anonymous. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002.
23. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – part 1: colony count technique in products with water activity greater than 0.95. ISO21527-1, 2008.
24. Anonymous. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – part 2: colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95. ISO 21527-2, 2008.
25. Yalçın H, Can ÖP. Tüketime hazır bazı et yemeklerinin mikrobiyolojik kaliteleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 2013; 10(1): 1-6.
26. Bostan K, Yılmaz F, Muratoğlu K, Aydın A. Pişmiş döner kebablarda mikrobiyolojik kalite ve mikrobiyel gelişim üzerine bir araştırma. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 2011; 17(5): 781-6.
27. Hatakka M. Hygienic quality of foods served on aircraft. *Academic Dissertation*, Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, 2000.
28. Pamuk Ş, Gürler Z, Yıldırım Y, Ertuş N. The microbiological quality of ready to eat salads sold in Afyonkarahisar, Turkey. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 2013; 19(6): 1001-6.
29. Arıcı M, Gümüş T, Şimşek O. Hazır salataların hijyenik durumu. *Gıda*, 2003, 28(6): 571-7.
30. İldız F, Çiftçioglu G. Toplu tüketim amacıyla üretilen gıdaların bazı patojen mikroorganizmalar yönünden incelenmesi. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 1997; 23(2): 405-12.
31. Can ÖP, Yalçın H. Mersin’de tüketime sunulan kremalı pastaların mikrobiyolojik kalitelerinin değerlendirilmesi. *Gıda Teknol Elektr Derg*, 2011; 6(3): 42-8.

Manisa'da aynı yemek şirketinden yemek alan farklı işletmelerde meydana gelen stafilocok kaynaklı besin zehirlenmesi

Food poisoning caused by staphylococcus in various workplaces getting food from the same catering company in Manisa

Ali Hasan ZUBAROĞLU¹, Ali BOZ¹, Selmur TOPAL², Fehminaz TEMEL¹,
Mustafa Bahadır SUCAKLI¹, Belkis LEVENT³, Gonca ATASOYLU⁴, Metin KIZILELMA⁵

ÖZET

Amaç: Manisa'da aynı yemek şirketinden yemek alan 23 farklı kurumda besin zehirlenmesi meydana gelmiş ve çok sayıda kişi etkilenmiştir. Bu araştırma, sorunun kaynağını tespit etmek, koruma ve kontrol önlemlerini almak amacıyla yapılmıştır.

Yöntem: 25.04.2014 öğle yemeği sonrası farklı işletmelerden çok sayıda kişinin sağlık kurumlarına başvurdukları bildirilmiştir. İşletmelerdeki personel sayısının fazla olması ve bütün çalışanlara ulaşılmasının zorluğu nedeniyle vaka kontrol çalışması planlanmıştır. Araştırma; atak hızının en yüksek ve vaka sayısının en fazla olduğu yedi işyerinde yapılmıştır. Anketler yüz yüze görüşülerek doldurulmuştur. Enfektif etken tespiti için su, gıda ve klinik örnekler alınmıştır.

Bulgular: Araştırmada 94 vakaya ulaşılmış ve aynı sayıda kontrol seçilmiştir. Vakaların tamamında ishal ve kusma, %94,7'sinde bulantı %85,1'inde halsizlik, %83'ünde karın ağrısı ve %38,3'ünde ateş olduğu belirlenmiştir. Vakaların ortalama inkübasyon süresi 3 saat 42 dakika (En düşük= 35 dk. - En yüksek= 7 saat 30 dk.) olarak bulunmuştur. Salgın eğrisi incelendiğinde olayın tek kaynaklı salgın olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: A food poisoning occurred in 23 different workplaces, obtaining food from the same catering company in Manisa and many people were affected. This research was conducted to identify the source of the problem and control and preventive measures.

Method: On April 25th 2014, many workers from various workplaces were admitted to the health institutions after lunch. Due to the high number of staff in the workplaces and difficulty of reaching all of them, a case-control study was planned. Research was conducted in seven workplaces which had both the highest number of cases and attack rate. Data was collected through a questionnaire. Water, food and clinical samples were taken to identify the infective agent.

Results: In this research 94 patients were reached and same number of controls were selected. Diarrhea and vomiting were present among all cases; in 94.7% nausea, in 85.1% fatigue, in 83% abdominal pain and in 38.3% fever. Average incubation period of cases was 3 h and 42 min (Min= 35 min - Max= 7 h and 30 min). Epidemic curve showed a point source outbreak. The odds of "Eating Apricot Ball Dessert" was found 8.7 times

* Bu araştırma; 20-24 Ekim 2014 tarihlerinde Edirne'de düzenlenen 17. Ulusal Halk Sağlığı Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

¹ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, ANKARA

² Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Bulaşıcı Hastalıklar Daire Başkanlığı, ANKARA

³ Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, ANKARA

⁴ Manisa Halk Sağlığı Müdürlüğü, MANİSA

⁵ İzmir Halk Sağlığı Müdürlüğü, İZMİR



İletişim / Corresponding Author : Ali Hasan ZUBAROĞLU

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi Daire Başkanlığı, ANKARA

Tel : +090 312 565 2526

E-posta / E-mail : ahzubaroglu@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 14.05.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 11.06.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.38991

Zubaroğlu AH, Boz A, Topal S, Temel F, Sucaklı MB, Levent B, Atasoylu G, Kızılelma M. Manisa'da aynı yemek şirketinden yemek alan farklı işletmelerde meydana gelen stafilocok kaynaklı besin zehirlenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 209-18.

Vakalarda kontrollere göre “Kayısı Topu Tatlısı” yeme tahmini rölatif riski 8,7 kat olarak bulunmuştur (%95 GA = 1,1-71,4). Diğer gıdaların tüketimleriyle hastalık arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Alınan gıda numunelerinde kayısı topu tatlısında *Staphylococcus aureus* tespit edilmiştir. Kayısı topu tatlısının üretildiği işletme çalışanlarından birinin nazal sürüntüsünde *S. aureus* izole edilmiştir. Ancak yapılan ileri analizlerde bu suş ile gıda izolatından elde edilen suşun moleküler düzeyde birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir.

Sonuç: Laboratuvar sonuçları ve epidemiyolojik analizler sonucunda yaşanan besin zehirlenmesinin kaynağının kayısı topu tatlısı olduğu belirlenmiştir. Geriye dönük gıda takibi yapılmış ancak bulaşın ne şekilde olduğu belirlenememiştir. Benzer olayların tekrar yaşanmaması için ilgili yemek şirketindeki hijyen eğitimleri eksik olan personelin eğitim alması sağlanmış, taşıyıcılık tespit edilen çalışan tedavi edilmiş, ayrıca tedarikçi firmaya para cezası verilmiştir. Besin zehirlenmelerinde kaynağın belirlenmesi ve bulaş zincirinin tespiti amacıyla Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı'nın zamanında ve ortak hareket etmesi gerekmektedir, bu nedenle uygun yasal düzenlemeler geliştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: Vaka-Kontrol Çalışması, Stafilocokal Besin Zehirlenmesi, Salgın, Manisa

in cases when compared to controls (95% CI = 1.1-71.4). There was no significant association between the other food items and the disease. Analysis of food samples were revealed “*Staphylococcus aureus*” in apricot ball dessert. *S. aureus* was also isolated from a nasal swab of an employee working in the kitchen of the catering company that produced the apricot ball dessert. However, further analysis of these two strains revealed that the isolates were different from each other at molecular level.

Conclusion: Epidemiological and laboratory findings showed that apricot ball dessert was the origin of food poisoning. Although traceback investigation of food was conducted the route of contamination has been fined. In order to prevent reoccurrence of similar incidents; training was provided for food-company workers who does not have hygiene training; the porter worker was treated, and besides supplier company could not be determined. Ministry of Health and Ministry of Food, Agriculture and Livestock should act timely and together to identify the source and chain of transmission in food poisoning incidents. For this purpose convenient legal regulations should be improved.

Key Words: Case-Control Study, Staphylococcal Food Poisoning, Outbreak, Manisa

GİRİŞ

Patojen bir mikroorganizma ya da onun ürettiği toksini içeren bir gıdanın tüketimi sonucu ortaya çıkan hastalıklara “Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar” denilmektedir. Gıda kaynaklı mikrobiyal hastalıklar; gıda kaynaklı enfeksiyonlar ve gıda kaynaklı zehirlenmeler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Gıda maddesinin patojen bir mikroorganizma ile kontamine olması ve bu mikroorganizmanın çoğalarak toksin salgılaması sonrası, bu gıda maddesinin tüketilmesiyle meydana gelen zehirlenmeye ise “Gıda Kaynaklı Zehirlenme” adı verilmektedir (1).

Gıdaların mikrobiyal etkenlerle enfekte edilmesi; gıdaların hazırlama, saklama, taşıma ve

sunum aşamalarında hijyen kurallarına uyulmaması nedeniyle olabilmektedir. Gelişen bulguların şiddeti; karın ağrısı, bulantı, kusma, ishalden gıda kaynaklı zehirlenmeye bağlı ölümlere kadar değişen geniş bir spektrum şeklinde görülmektedir.

Amerikan Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (CDC) tarafından yapılan tanıma göre “Gıda Kaynaklı Salgın”; ortak bir gıdanın tüketilmesi sonrası iki veya daha fazla kişide aynı zaman ve yerde benzer belirtiler gösteren hastalık tablosunun ortaya çıkması durumudur (2).

ABD, gıda güvenliği konusunda dünyadaki en ileri ülkelerden biri olmasına rağmen ABD Tarım

Bakanlığı'nın raporlarına göre; her yıl yaklaşık 8,9 milyon Amerikalının gıda kaynaklı bir hastalık geçirdiği düşünülmektedir. Yıllık yaklaşık 53.245 kişinin hastanelerde yatarak tedavi edildiği, 2.377 kişinin ise hayatını kaybetmesine neden olduğu tahmin edilmektedir. Tüm bunların ABD'ye ekonomik yükünün yıllık 15,6 milyar dolar olduğu belirtilmektedir (3).

Günümüzde 250'den fazla gıda kaynaklı hastalık tanımlanmaktadır. Bunlar bakteri, virüs, mantar ve parazitlerin kendilerinin veya toksik ürünlerinin gıdalara bulaşması sonucu ortaya çıkmaktadır. Etken açısından bazı farklılıklar göstermekle beraber gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklar sıklıkla görülebilmektedir (4).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Marmara bölgesinde perakende olarak satılan 1070 gıda örneğinde inceleme yapılmıştır. Patojen etken saptanan 147 örneğin 92 (%62,6)'sinin stafilokokal toksinler ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (5). Bu da tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de stafilokokal besin zehirlenme riskinin yüksek olduğunu göstermektedir.

İnsanların yaklaşık %20'sinin *Staphylococcus aureus* açısından sürekli taşıyıcı durumunda olduğu, %20'sinin hiçbir şekilde *S. aureus* ile kolonize olmadığı, %60'ının ise dönem dönem burunlarında *S. aureus* taşıyabildikleri belirlenmiştir. Genelde toplumun %33'ünün burnunda *S. aureus* saptanmaktadır (6).

S. aureus insanda; nazofarinks, deri, vajina, rektum, perine ve özellikle burunda yaygın kolonizasyon gösterir. Bu da *S. aureus*'un gıda elleyicilerinden rahatlıkla yemeklere bulaşmasına neden olmaktadır. Nemli ellerle yüzeylere ve yiyeceklere kolayca bulaş mümkün olduğundan yemek hazırlama, taşıma ve sunum aşamalarında hijyen kurallarına azami ölçüde dikkat edilmesi çok önemlidir.

S. aureus besin zehirlenmesi salgınlarının araştırılmasında doğrulama için şüpheli besinden, hastaların kusmuklarından, besin hazırlayıcıların ellerinden, burunlarından veya deri lezyonlarından

izole edilen *S. aureus* suşlarının aynı faj tipi olduğu gösterilebilmektedir (7).

Bu çalışmada; aynı yemek şirketinden yemek alan 23 farklı işyerindeki çalışanlarda meydana gelen besin zehirlenmesi; ortaya çıkan halk sağlığı sorununun kaynağının tespiti, koruma, kontrol önlemlerinin alınması ve bu tür olayların tekrar yaşanmasının önlenmesi amacıyla incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Manisa'da 25.04.2014 günü saat 16:00 sularında Manisa Halk Sağlığı Müdürlüğü'ne şüpheli bir besin zehirlenmesi olayı ihbarı yapılmıştır. Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) Erken Uyarı-Cevap ve Saha Epidemiyolojisi (EUCSE) Daire Başkanlığı'na aynı yemek şirketinden yemek alan farklı iş yerlerinde çok sayıda kişinin bulantı, kusma, karın ağrısı, terleme, halsizlik şikâyetleriyle sağlık kurumlarına başvurdukları bilgisi aynı gün iletilmiştir. Etkilenen kişi sayısının fazlalığı ve olayın toplum sağlığını etkileme riski taşıması nedeniyle THSK EUCSE Daire Başkanlığı tarafından araştırma kararı alınmıştır. Salgın inceleme çalışmaları 29 Nisan-2 Mayıs 2014 tarihleri arasında EUCSE Daire Başkanlığı'ndan görevlendirilen personel ile Manisa Halk Sağlığı Müdürlüğü personeli tarafından, tedarikçi firmada yapılan inceleme ise 4 Haziran 2014 tarihinde İzmir Kemalpaşa Toplum Sağlığı Merkezi (TSM) personeli tarafından gerçekleştirilmiştir.

Salgının 23 işletmeyi etkilemesi, bu işletmelerdeki personel sayısının fazla olması ve tüm çalışanlara ulaşılmasının zorluğu nedeniyle vaka kontrol çalışması yapılmıştır. Çalışmada salgın boyutunu belirleyebilmek için öncelikle şüpheli vaka tanımı ve kontrol seçim kriterleri geliştirilmiştir.

Sağlık kurumlarına başvuran kişilerin muayene kayıtlarında iş yeri bilgisi kaydedilmediği için vaka bulmada hastane bilgi sistemlerinden yararlanılamamıştır.

2012 yılında düzenlenen 6331 sayılı "İş Sağlığı ve Güvenliği Kanunu"nun 14. maddesine göre işveren iş

kazalarını üç iş günü içinde Sosyal Güvenlik Kurumu (SGK)'na bildirmekle yükümlü olduğu belirtilmektedir. Buna uygun olarak yaşanan besin zehirlenmesinden sonra etkilenen ve sağlık kurumuna başvurarak rapor alanların, işyerlerinin insan kaynakları birimlerince SGK'ya bildirildiği belirlenmiştir. İnsan kaynakları birimlerindeki kayıtlar kullanılarak vakalara ulaşılmıştır.

Şüpheli vaka, "25.04.2014 tarihinde ilgili işyerlerinde çalışan; 25-26.04.2014 tarihlerinde bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, ateş şikâyetlerinden en az birisi olan kişiler" olarak belirlenmiştir. Kontroller ise, "25.04.2014 tarihinde ilgili işyerlerinde çalışan; bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal veya ateş şikâyetleri bulunmayan kişiler" olarak tanımlanmıştır. İlk belirlemelere göre 23 farklı işyerinde yaklaşık 2700 kişinin yemek yediği, bunların 257'sinin şüpheli vaka tanımına uyduğu tespit edilmiştir.

Çalışma alanının geniş olması nedeniyle; araştırma için, atak hızının en yüksek ve vaka sayısının en fazla olduğu dokuz işyeri belirlenmiştir. İşletmelerle yapılan görüşmelerde; çalışmanın yapıldığı tarihlerde iki işletmenin personel ve zaman açısından uygun olmadıklarını belirtmeleri üzerine, çalışma yedi işyerinde yapılmıştır.

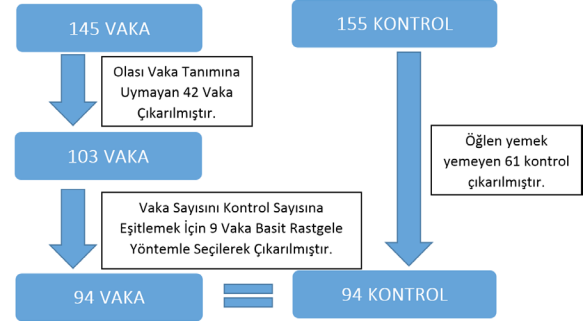
İshal ve kusmanın birlikte bulunduğu şüpheli vakalar olası vaka olarak tanımlanmış ve analizlerde bu tanıma uyan vakalar kullanılmıştır. Yüz-yüze görüşme ile uygulanan ankette çalışanlara sosyo-demografik özellikler, yemek yeme durumu ve semptomlar sorulmuştur. Anket çalışması için Manisa Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından, Yunusemre ve Şehzadeler TSM'lerinden 18 kişi görevlendirilmiştir. Anket uygulaması, 30 Nisan ve 2 Mayıs 2014 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir.

Firmalardaki tüm çalışanların olduğu listeler alınarak; vakalar ve 25.04.2014 tarihinde izinli olan kişiler listeden çıkarılmış, geriye kalanlardan sistematik örnekleme yöntemiyle kontroller seçilmiştir.

Open Epi programıyla %95 güven aralığı, %80 güç, kontrollerin tahmini etken maruziyeti %90 ve beklenen tahmini rölatif risk 8 alınarak yapılan hesaplamalarda 114 vaka ve 114 kontrol sayısı belirlenmiştir.

Anket uygulanacak örneklem büyüklüğü hesaplamasında ulaşılama, reddetme ve kontrol seçim kriterlerine uymama durumları göz önüne alınarak %50 cevapsızlık hızı düşünülerek ilgili işletmelerdeki tüm vakalara ve 171 kontrole ulaşılması hedeflenmiş ancak, 145 vaka ve 155 kontrole ulaşılabilmektedir.

Anket uygulanan 145 vakanın 103'ünün olası vaka tanımına uyduğu belirlenmiştir. 25.04.2014 tarihinde işyerinde öğlen yemek yemeyen kontroller veri setinden çıkarılmış, geriye 94 kontrol kalmıştır. Vaka ve kontrol sayılarını eşitlemek için dokuz vaka da basit rastgele yöntemle belirlenerek veri setinden çıkarılmıştır (Şekil 1). Analizler SPSS 22, Epi Info ve Open Epi programları kullanılarak 94 vaka ve 94 kontrol üzerinden yapılmıştır.



Şekil 1. Vaka ve kontrol seçimi

Analizlerde, yüzde dağılımı, atak hızı, %95 güven aralığı (GA) ve tahmini rölatif risk (TRR) hesaplanmıştır.

Manisa İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü personeli tarafından 25.04.2014 tarihinde ilgili yemek şirketine gidilerek inceleme yapılmıştır. Öğle yemeğinde işletmelere tavuk sote, erişte, toyga çorbası ve kayısı topu tatlısının verildiği belirlenmiştir. İncelemede tavuk sote, erişte ve toyga çorbasının porselen tabaklarla dağıtıldığı ancak; kayısı topu

tatlısının plastik kaselerde verildiği; bazı kâselerin kapaklı çoğunun ise kapaksız olduğu tespit edilmiştir. Tüm yemeklerden numune alınmış ve yemeklerin dağıtımını durdurulmuştur. Yemeklerden alınan numuneler yayma plak yöntemiyle analiz edilmiştir.

Manisa Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından vaka çıkan dört işletmenin şebeke sularından örnekler alınarak İzmir Halk Sağlığı Laboratuvarı'na gönderilmiştir. Su numuneleri *Escherichia coli*, Koliform Bakteri, *Clostridium perfringens* ve Enterokok patojenleri açısından değerlendirilmiştir.

Vakalardan alınan dört taze gaita örneği soğuk zincir koşullarında THSK Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı'na iletilmiştir.

BULGULAR

Araştırmada vakaların %79,8'i ile kontrollerin %78,7'si erkektir. Vakalar (Ort. \pm SS = 34 \pm 8,9 yıl) ve kontroller (Ort. \pm SS = 34 \pm 9,2 yıl) benzer yaş ortalamalarına sahiptir. Vakalarda ishal ve kusmaya ek olarak, %94,7'sinde bulantı %85,1'inde halsizlik,

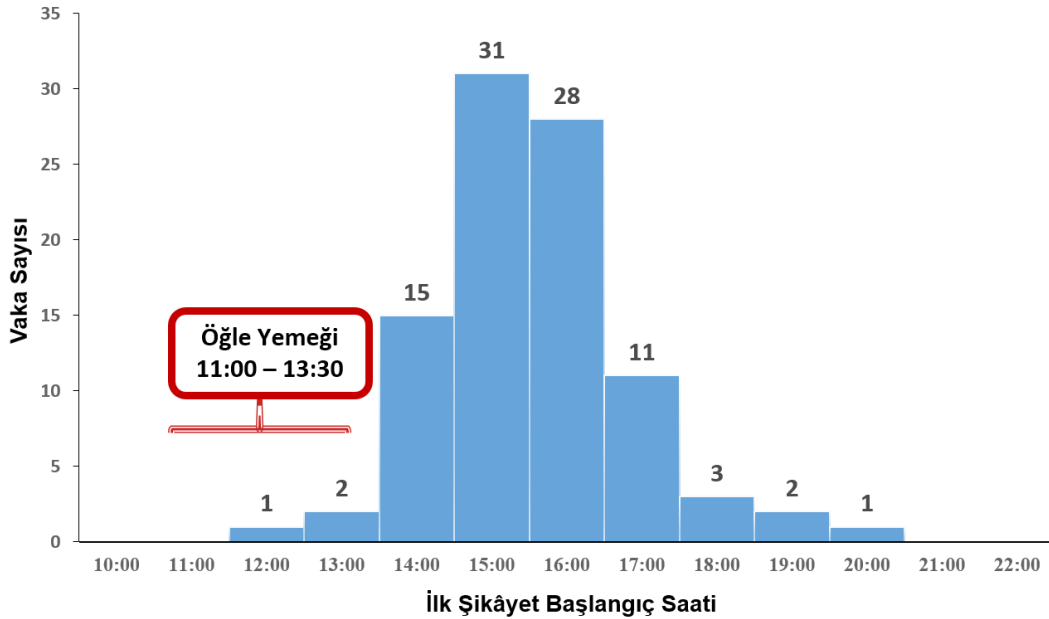
%83'ünde karın ağrısı, %38,3'ünde ateş olduğu belirlenmiştir.

Yemek firmasından elde edilen bilgilere göre öğle yemeği 11:00 - 13:30 saatleri arasında dağıtılmıştır. Vakalar, ilk şikâyet başlama saatine göre değerlendirildiğinde; şikâyetlerin 24 Nisan 2014 tarihinde saat 12:55'te başladığı, vaka sayısının 15:00-16:00 saatleri arasında pik yaptığı, saat 20:00'den sonra vaka görülmediği tespit edilmiştir (Grafik 1).

Ortalama inkübasyon süresi 3 saat 42 dakika (SS= 1 saat 9 dk.), ortanca inkübasyon süresi 3 saat 30 dakika (En düşük= 35 dk. - En yüksek= 7 saat 30 dk.) olarak bulunmuştur. Salgın eğrisi incelendiğinde olayın tek kaynaklı salgın olduğu düşünülmüştür.

25 Nisan 2014 tarihinde ilgili işletmelerde dağıtılan öğle yemeği menüsündeki yiyeceklerin vaka ve kontrol gruplarında tüketim durumları ve yiyeceklerin tahmini rölatif riskleri Tablo 1'de verilmiştir.

Öğle yemeği menüsünde dağıtılan yemeklerin tüketimi değerlendirildiğinde vakalarda kontrollere göre "kayısı topu tatlısı" yeme tahmini rölatif riski 8,7



Grafik 1. Vakalarda ilk şikâyetlerin başlama saatlerine göre dağılımı (Nisan 2014, Manisa)

kat (%95 GA = 1,1 - 71,4) olarak bulunmuştur. Diğer gıdaların tüketimi ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 1).

Kayısı topu tatlısının kapaklı ya da kapaksız kâselerde sunulması ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 2).

Bakılan doz-cevap ilişkisi analizlerinde kayısı topu tatlısı yeme miktarı ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Tablo 3).

Tablo 1. Vaka ve kontrollerde gıda tüketim durumları (Nisan 2014, Manisa)

Yiyecekler	Vaka		Kontrol		TRR (%95 GA)
	Sayı	%	Sayı	%	
Toyga Çorba	52	55,3	59	62,8	0,7 (0,4-1,3)
Tavuk Sote	88	93,6	87	92,6	1,1 (0,3-3,6)
Erişte	68	72,3	71	75,5	0,8 (0,4-1,6)
Kayısı Topu Tatlısı	94	100	86	91,5	8,7 (1,1-71,3)*

* Kayısı topu tatlısı yemeyen vaka olmadığı için tatlı yemeyen vaka sayısı 1 kabul edilerek, TRR hesaplanmıştır.

Tablo 2. Vaka ve kontrollerin kayısı topu tatlısını kapaklı-kapaksız kâselerde yeme durumları (Nisan 2014, Manisa)

Kayısı Topu Tatlısı	Vaka		Kontrol		TRR (%95GA)
	Sayı	%	Sayı	%	
Kapaklı Kâse	5	5,3	5	5,3	1,0 (0,2-3,5)
Kapaksız Kâse	89	94,7	81	86,2	2,9 (0,9-8,3)

Tablo 3. Vaka ve kontrollerin kayısı topu tatlısını yeme miktarlarının dağılımları (Nisan 2014, Manisa)

Tatlı Yeme Miktarı	Vaka	Kontrol	Toplam
Tam	86	74	160
Yarım	3	6	9
Biraz	5	6	11
Toplam	94	86	180

p= 0,28

Su numunelerinde İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'e göre uygunsuzluk tespit edilmemiştir. Vakalardan alınan dört gaita örneğinden yapılan kültürlerde herhangi bir patojen etken ürememiştir. Gıda numunelerinden tavuk sote, toyga çorba ve eriştelerde üreme saptanmamış ancak; kayısı topu tatlısında *S. aureus* üremiştir.

Kayısı topu tatlısının geriye dönük izleminde tatlının İzmir Kemalpaşa'da hizmet veren tedarikçi firma tarafından üretilerek tüketime hazır şekilde Manisa'daki yemek şirketine ulaştırıldığı saptanmıştır.

Tedarikçi firma ile yapılan görüşmede kayısı topu tatlısının; hazır, toz halindeki pasta kremasına sıvı hâldeki bitkisel krema ve şebeke suyundan arıtılarak elde edilen su ile karıştırılarak kremanın hazırlandığı, daha sonra kremaya kayısı, incir ve üzüm kuruları eklenerek plastik kâselere doldurulduğu ve üzerine hindistan cevizi serpiştirilerek soğutulmaya bırakıldığı belirtilmiştir. Sonrasında yirmişerli şekilde karton kutulara yerleştirildiği ve soğutucu kasalı araçlarla tüketim yerlerine götürüldüğü ifade edilmiştir (Şekil 2-3).

Kayısı topu tatlısının üretiminde kullanılan; pasta kremasının kullanıma hazır toz halinde paketlenmiş ve oda sıcaklığında saklamaya elverişli şekilde olduğu; bitkisel kremanın ise kullanıma hazır şekilde bulunduğu, tetrapak kutularda +4 °C'de muhafaza edildiği gözlenmiştir. Tatlı yapımında kullanılan tüm malzemelerin son kullanma tarihlerinin uygun olduğu belirlenmiştir.

Tatlının üretildiği tedarikçi firmanın İzmir'de bulunması ve bürokratik gecikmelerden dolayı İzmir'deki araştırma salgından yaklaşık kırk gün sonra yapılabildiği. İmalat bölümünde çalışan 8 personelin tamamından nazal sürüntü örnekleri alınmış bir örnekten *S. aureus* izole edilmiştir.

Nazal sürüntüde bulunan izolat ile gıdadan elde edilen izolatların aynı tür olup olmadıklarının



Şekil 2. Kayısı topu tatlısı



Şekil 3. Kayısı topu tatlısının dağıtımı

araştırılması için moleküler eşleştirme yapılması amacıyla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında gıdadan elde edilen izolat talep edilmiştir. Mevcut mevzuat, izolat paylaşımı konusunda herhangi bir hüküm içermediğinden bürokratik engellerle karşılaşmış, izolatların elde edilmesinde zorluk yaşanmıştır.

Yapılan moleküler eşleştirmede gıda ve klinik izolatlardan elde edilen suşların moleküler düzeyde birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Stafilokokal besin zehirlenmesi; bir besin üzerinde üreyen *S. aureus*'un saldırdığı toksinin besin ile birlikte vücuda alınması sonucu 30 dakika ile 8 saat içinde gelişen ve yine kısa sürede düzelen bulantı ve kusmanın hâkim olduğu klinik tablo şeklinde tarif edilmektedir (8). Olguların %68'inde ishal gelişmekte; karın ağrısı eşlik etmekte ve %18'inde ateş bildirilmektedir. Hastalık sekiz saat içinde çoğunlukla kendiliğinden iyileşebilmektedir. Tedavide sıvı ve elektrolit replasmanı yeterlidir, antibiyotik tedavisi gerekmemektedir. Kesin tanı için tüketilen

yiyeceklerin kültürlerinin yapılması, yiyeceklerin hazırlama, taşıma ve sunum kademelerinde çalışan personelin *S. aureus* portörü olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Stafilkokal besin zehirlenmelerinde bulaş olan besinin görünüm ve kokusunda bir bozulma olmamaktadır (7).

Çalışmamızda vakaların çoğunlukla ishal, kusma, bulantı, karın ağrısı ve ateş şikâyetlerinin *S. aureus* enfeksiyonlarında görülen semptomlarla benzerlik göstermesi; salgının *S. aureus* kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. İnkübasyon periyodu değerlendirildiğinde, *S. aureus* ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışanlar tatlının görünüm ve kokusunun normal olduğunu beyan etmişlerdir. Bu da *S. aureus* lehine bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Birçok besin *S. aureus* üremesi için uygun ortam oluşturmaktadır. Stafilkokal besin zehirlenmelerinde özellikle süt, krema, kremalı pastalar, tereyağı, jambon, sosis, konserve et ve salatalar, rol oynamaktadır (8).

Araştırdığımız salgına da bir sütlü tatlı olan kayısı topu tatlısı neden olmuştur. Ancak, tatlı yapımında süt kullanılmadığı firma yetkililerince ifade edilmiş, pasta kreması ile bitkisel kremanın

saklama koşullarının ve miatlarının uygun olduğu tespit edilmiştir.

İncelenen salgına neden olan tatlının, tüketime hazır şekilde Manisa'ya taşındığı, Manisa'daki yemek şirketi personeli tarafından, tatlıya herhangi ek bir işlem uygulanmaksızın doğrudan dağıtıldığı belirlenmiştir. Bulaşın dağıtıcı personel kaynaklı olabilmesi için vaka çıkan tüm iş yerlerindeki dağıtıcı personelin taşıyıcı olması gerektiği, bu ihtimalin de çok düşük olduğu düşünülmüştür. Ayrıca kayısı topu tatlısının kapaklı kapaksız kâselerde sunulması ile hastalık arasında anlamlı bir ilişki bulunmaması da bulaşın taşıyıcı personel kaynaklı olmadığı lehine bir bulgu olarak değerlendirilmiştir.

Saklama ve/veya taşıma koşullarının muhtemel uygunsuzluğunun tek başına bulaş açıklayamayacağı, bulaş için mutlaka kaynak gerektiği aşikârdır. Tüm bu nedenlerden dolayı bulaşın İzmir'de üretim/imalat aşamasında olabileceği düşünülmüştür.

Üretim imalat aşamasındaki muhtemel bulaşa; taşıyıcı bir personelin neden olabileceği düşünülerek ilgili firma çalışanlarının nazal sürüntüleri alınarak incelenmiş; kültür sonuçlarında, bir çalışmada *S. aureus* izole edilmiş ancak; moleküler eşleştirmede gıdadan elde edilen izolat ile nazal sürüntüde bulunan izolatın farklı suşlara ait oldukları belirlenmiştir.

Her ne kadar izolatların farklı suşları ait oldukları gösterilse de tatlı yapımında kullanılan malzemelerde bir sorun bulunmaması, taşıma ve dağıtım aşamasındaki uygunsuzluğun tek başına bulaş açıklayamamasından dolayı bulaşa taşıyıcı bir personelin neden olması muhtemeldir. Salgınla nazal sürüntü örneklerinin alınması arasında kırk gün geçtiği için tatlının üretimi esnasında;

a) Başka bir çalışan enfekte olup, aradan geçen süre zarfında iyileşmiş olabilir,

b) Tatlı üretimi esnasında çalışıp taşıyıcılık araştırılana kadar geçen sürede işten ayrılan bir personel taşıyıcı olabilir, bu nedenle taşıyıcılığın tespit edilemediği düşünülmüştür.

Hacıbektaşoğlu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada gıda sektöründe çalışan 450 personelin burun ve boğaz kültürlerine bakılmıştır. Bakılan personelin 54'ünde burun, 6'sında boğaz birinde burun ve boğazda patojen etken bulunmuştur. Bulunan patojen etkenlerin %85'inin *S. aureus* olduğu belirlenmiştir (9). Vançelik ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada Erzurum il merkezinde gıda ile uğraşan 142 kişiden burun, boğaz, tırnak ve gaita örnekleri alınmıştır. Çalışanların boğaz kültürü üremelerinde %2,1; tırnak kültürü üremelerinde %12 ve burun kültürü üremelerinde %28,2'sinde taşıyıcılığı tespit edilmiştir (10). Sepin-Özen ve ark. tarafından yapılan gıda sektöründe çalışan 15.600 kişilik geniş bir çalışmada Eylül 2009-Nisan 2010 tarihleri arasında portör muayenesi için başvuruların nazal sürüntü örnekleri incelenmiş, 526 (%3,37) kişinin burun kültüründen *S. aureus* izole edilmiştir (11). Tüm bu örnekler ülkemizde gıda sektöründe çalışanlar arasında *S. aureus* taşıyıcılığının yüksek olduğunu göstermektedir.

Epidemiyolojik çalışmanın dokuz işletmede planlanması ancak yedisinde yapılabilmesi; 155 kontrole ulaşılmamasına rağmen 94'ünün o gün işyerinde öğle yemeği yemedikleri için analizlerden çıkarılması ve dolayısıyla 114 sayısına ulaşamaması; anket uygulamasının salgından dört gün sonra yapılması nedeniyle kişilerin ne yediklerini tam olarak hatırlayamaması, İzmir'deki çalışmanın salgından ancak kırk gün sonra yapılabilmesi ve besin zehirlenmesi döneminde tedarikçi firmada çalışıp da inceleme sırasında işten çıkan olup olmadığının tespit edilememesi çalışmanın kısıtlılıklarını oluşturmaktadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Laboratuvar sonuçları ve epidemiyolojik analizler, yaşanan besin zehirlenmesine *S. aureus* ile enfekte olmuş kayısı topu tatlısının sebep olduğunu göstermektedir. Geriye dönük gıda takibi yapılmış ancak; bulaşın ne şekilde olduğu belirlenememiştir. *S. aureus* tarafından üretilen toksinler dış faktörlere çok dirençli olduğu için mutlaka kişisel hijyen ve temizlik kurallarına uyulması gerekmektedir (12).

Benzer olayların tekrar yaşanmaması için ilgili yemek şirketlerindeki hijyen eğitimleri eksik olan personelin eğitim alması sağlanmış, taşıyıcılık tespit edilen çalışan tedavi edilmiş, ayrıca; tedarikçi firmaya para cezası verilmiştir.

Besin zehirlenmelerinde kaynağın belirlenmesi ve bulaş zincirinin tespiti amacıyla Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı'nın zamanında ve ortak hareket etmesi gerekmektedir, bu nedenle uygun yasal düzenlemeler geliştirilmelidir.

TEŞEKKÜR

Manisa Halk Sağlığı Müdür Yardımcısı Dr. Galip KÖROĞLU'na, Bulaşıcı Hastalıklar Şube Müdürlüğü'nden Dr. Özgür SEKRETER'e, Şehzadeler TSM Başkanı Uzm. Dr. Müjde İLGÜN ve TSM Tabibi Dr. Şebnem GÜVENÇ'e, salgın incelemesinde görev alan tüm Manisa Halk Sağlığı Müdürlüğü, Yunussemre TSM, Şehzadeler TSM ve İzmir Kemalpaşa TSM personeline katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Dorman V, Aslan S, Ceylan A, Küçük N S, Günel A, Sarı H ve ark. Aynı fabrikadan yemek alan iki inşaat firması işçilerinde meydana gelen toplu besin zehirlenmesi. Dicle Tıp Derg, 2000; 37(3): 248-53.
2. CDC. Guidelines for Confirmation of Foodborne-Disease Outbreaks. MMWR, March 17, 2000/49(SS01); 54-62. (<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss4901a3.htm>) (İnternet erişim: 13.01.2015)
3. Food Safety News. <http://www.foodsafetynews.com/2014/10/foodborne-illnesses-cost-usa-15-6-billion-annually/#.VLUyKiusUgl> (İnternet erişim: 13.01.2015)
4. Ayçiçek H., Aktan H.T. Gıda kaynaklı salgınlarda soruşturma ilkeleri. Türk Hij Den Biyol Derg, 2003; 60(3): 95-9.
5. Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. Int J Food Microbiol, 2011; 148(2): 99-106.
6. Wilke Topçu A. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Bölüm XXVII: Bakteri Enfeksiyonları. 3. Baskı, İstanbul, 2008; 2067-8.
7. Wilke Topçu A. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Bölüm XIII: Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonları. 3. Baskı, İstanbul, 2008; 1064-5.
8. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet Mol Res GMR, 2003; 2(1): 63-76.

9. Hacibektaşođlu A, Eyigün CP, Ozsoy MF. Nose and throat carriage in "food handlers". Mikrobiyol Bul, 1993; 27(1): 62-70.
10. Vançelik S, Özbek A, Güraksın A. Erzurum İlinde gıda ile uğraşan kişilerin taşıyıcılık ve kişisel hijyen durumları. Atatürk Üniv Tıp Derg, 2004; 36: 1-4.
12. Sepin-Özen N, Tuđlu-Ataman Ş, Seyman D, Aldađ H, Emek M. Antalya İli gıda çalışanlarında nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve MRSA oranlarının üç farklı yöntem kullanılarak incelenmesi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2013; 70(2): 51-8.
12. Bilici S. Besin Zehirlenmeleri, Nedenleri Ve Korunma Yolları. Bölüm V: Besin Enfeksiyonlarına Neden Olan Bakteriler ve Korunma Yolları 1. Baskı, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 727, Ankara, 2008; 17-8.

Characterization of sericin protein recovered from silk wastewaters

İpek atıksularından geri kazanılan serisin proteininin karakterizasyonu

Gökşen ÇAPAR¹, Seylan Saniye AYGÜN²

ABSTRACT

Objective: This study aims to determine the characteristics of sericin protein recovered from silk wastewaters.

Method: Sericin protein was recovered from silk wastewaters by membrane technology in Engineering Sciences Department of the Middle East Technical University between 2007 and 2008. The protein characterization study was completed in Ankara University Water Management Institute in 2012. The recovered protein was characterized in terms of molecular weight, moisture and ash contents, elemental and amino acid compositions. Dialysis was adopted to purify the protein. Sericin was extracted from native cocoons via hydrothermal processing. The solubility of recovered sericin samples at various pH values was determined. 2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF analyses were used for protein identification.

Results: The molecular weight range of recovered sericin was found as 40-176 kDa, with 86-96 kDa at the highest fraction of 79-97%. The recovered sericin was classified as high-molecular weight sericin, which is suitable for making biomaterials and membranes. Moisture and ash contents were found as; 2.8-3.9% and 11.3-14.4%. In terms of elemental composition, C, H, N contents of recovered sericin were determined as; 36.7-45.3%, 5.4-8.8% and 10.2-16.8%, respectively. Properties of recovered sericin were quite similar to the reference sericin used in this study and those reported

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, ipek atıksularından geri kazanılan serisin proteininin özelliklerini belirlemektir.

Yöntem: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Bölümü'nde 2007-2008 yılları arasında ipek atıksuyundan membran teknolojisi ile serisin proteini geri kazanılmıştır. Protein karakterizasyon çalışması Ankara Üniversitesi Su Yönetimi Enstitüsü'nde 2012 yılında tamamlanmıştır. Geri kazanılan protein moleküler ağırlık, nem ve kül içeriği, elementel analiz ve amino asit kompozisyonu yönünden incelenmiştir. Proteinin saflaştırılması için diyaliz işlemi uygulanmıştır. Serisin kozadan hidrotermal işlemle ekstrakte edilmiştir. Geri kazanılan proteinin farklı pH değerlerinde suda çözünürlüğü belirlenmiştir. Protein tanımlanması için 2-D jel elektroforez ve MALDI-TOF analizleri kullanılmıştır.

Bulgular: Geri kazanılan serisinin molekül ağırlık aralığı 40-176 kDa olarak tespit edilmiş, en yüksek fraksiyonun ise 86-96 kDa aralığında ve %79-97 oranında olduğu bulunmuştur. Geri kazanılan serisin, biyomalzeme ve membran yapmaya uygun olan yüksek-molekül ağırlıklı serisin olarak sınıflandırılmıştır. Nem ve kül içerikleri %2,8-3,9 ve %11,3-14,4 olarak bulunmuştur. Geri kazanılan serisinin elementel kompozisyonunda, C, H, N içerikleri sırasıyla %36,7-45,3; %5,4-8,8 ve %10,2-16,8 olarak bulunmuştur. Geri kazanılan serisinin özellikleri, bu çalışmada kullanılan referans serisine ve

¹ Ankara University, Water Management Institute, ANKARA

² Middle East Technical University, Engineering Sciences Department, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Gökşen ÇAPAR

Ankara University, Water Management Institute, ANKARA

Tel : +90 312 600 01 62

E-posta / E-mail : gcapar@ankara.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 12.02.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 01.03.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.47113

Çapar G, Aygün SS. Characterization of sericin protein recovered from silk wastewaters. Turk Hij Den Biol Derg, 2015; 72(3): 219-34.

in literature. Solution pH significantly influenced the solubility of recovered sericin, so ethanol was observed to be a better precipitation agent than the acids used. Although some amino acids were lost during processing, the amino acid composition was acceptable. Sericin recovered from silk wastewater, with a serine content of 28.9%, had the potential of high moisture absorption.

Conclusion: Sericin recovered from silk wastewaters is a promising raw material for potential applications in biomedical, cosmetics and pharmaceutical industries.

Key Words: Amino acid, molecular weight, sericin, silk, recovery

literatürde yer alan diğer sericin örneklerine oldukça benzer çıkmıştır. Çözelti pH'sı, geri kazanılan sericinin suda çözünürlüğünü belirgin bir derecede etkilemiş; bu nedenle etanolün, asitlere kıyasla daha uygun bir çöktürme ajanı olduğu gözlenmiştir. Bazı amino asitler uygulanan işlemler sırasında kaybedilmiş olsa da amino asit kompozisyonu kabul edilebilir bulunmuştur. İpek atıksuyundan geri kazanılan sericin, %28,9'luk serin içeriği ile yüksek nem tutma potansiyeline sahiptir.

Sonuç: İpek atıksuyundan geri kazanılan sericin biyomedikal, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde potansiyel uygulamalar için umut verici bir hammaddedir.

Anahtar Kelimeler: Amino asit, moleküler ağırlık, sericin, ipek, geri kazanım

INTRODUCTION

Sericin is a water soluble, globular and gummy protein secreted by the silkworm *Bombyx mori* in order to envelop the main silk fiber, namely fibroin, with sticky layers. In this way, the thin fibroin fibers are held together and the cocoon is formed. Sericin constitutes about 20-30% of the total cocoon weight (1). In textile industry, sericin is removed from the silk fiber and conventionally discharged together with silk processing wastewaters. These effluents cause severe environmental pollution in receiving water bodies due to their rich organic contents (2). However, sericin is a valuable protein with an economical value and it has a variety of end-uses in cosmetics, pharmaceutical and biomedical industries. The value of sericin on the global market varies with respect to its purity and purpose of use. For example, sericin suitable for cosmetics industry costs €40-120 per kg. On the other hand, pure sericin that is suitable for cell culture studies costs as high as € 70 per g. In recent years, investigations on sericin recovery from silk effluents have increased in view of promising research findings related to its useful properties such as antioxidation, UV resistance, moisture absorption and biocompatibility (3-4).

The annual production of silk cocoons is reported as 600.000 tons, from which 150.000 tons of sericin can be recovered (5). In Turkey, cocoon production has decreased dramatically since 1980s, however the current annual potential of sericin recovery is estimated as 13 tons approximately. These figures clearly show that sericin can provide significant economical benefits, if recovered from waste streams properly.

The recovery of a material from a waste stream requires that its properties are known and compatible with its original state so that it can be used safely. In this regard, characterization of sericin is very important for effective end-use of this protein. The characteristics of sericin obtained directly from the cocoon are well known (5-12). However, the properties of sericin recovered from textile effluents need to be determined (13-15). Recovered sericin can be used as a raw material in industries such as biotechnology and textile (16, 17).

Sericin can be recovered with different techniques such as precipitation in alcohol, enzymatic hydrolysis, freeze- and tray-drying and membrane filtration (2, 13, 15, 18, 19). As the method of recovery influences

the properties of the final product to a great extent, there is a need to determine the characteristics of recovered sericin so that its suitability for the target end-use can be assessed correctly. For example, molecular weight (MW) of sericin is affected by the factors such as temperature, pH and processing time. High MW sericin (greater than 20 kDa) is reported as suitable for making biomaterials and membranes, whereas low MW sericin (less than 20 kDa) is suitable for cosmetics, skincare products and medications (3).

In literature, there seems to exist very few studies on the characterization of sericin recovered from wastewaters. To this end, this study aims to characterize the sericin protein recovered from silk wastewaters generated in cocoon cooking process of textile industry. The characterization study covers MW, pH, moisture and ash contents, solubility, elemental composition (C, H, N) and amino acid analysis. Dialysis was also adopted to further purify the recovered protein. The properties of recovered sericin were compared with commercial and reference sericin used in our study and also with literature in order to evaluate its quality.

MATERIALS and METHODS

Extraction of sericin from native cocoons via hydrothermal processing:

Sericin was extracted from native cocoons that were obtained from the Sogut village of Bilecik city in Turkey. This sericin was called native sericin (SN) and it was used as reference for evaluating the quality of sericin recovered (SR) from cocoon cooking wastewaters. Another reference sericin, namely commercially obtained Brazilian sericin (SC) was also used for comparison. In order to obtain SN, the cocoon shells were cut into small pieces, followed by addition of ultra pure water at a cocoon to water ratio of 1:50 (w/w). Sericin was extracted from the cocoons by hydrothermal processing where the samples were autoclaved at 120 °C. The effect of process time on sericin solubility was determined in order to adopt the optimum reaction time. Three

samples were prepared, each containing 1 g cocoon, and autoclaved for 1 h, 2 h and 5 h, respectively. The sericin solutions obtained were filtered through 1.6 µm filter media (Whatman GF/A) to separate the cocoons from sericin solution. After filtration, cold ethanol was added slowly into sericin solution until a final ethanol concentration of 75% (v/v) was obtained. The supernatant of ethanol was discarded and the settled sericin was frozen at -80 °C. Then, it was dried in a lyophilizator to obtain powder sericin (8, 13).

Precipitation of sericin recovered from wastewater:

Ethanol is commonly used to precipitate sericin (6, 8, 13). However, the volumes that would be required for a real wastewater treatment plant effluent are excessive. Sericin can also be precipitated with acids using much smaller volumes as it becomes insoluble at pH 3.8 (20). In this regard, nitric acid, hydrochloric acid, acetic acid and sulfuric acid were tested as an alternative to ethanol in an attempt to reduce chemical consumption.

Sericin was separated from cocoon cooking wastewater via membrane processes, whose details are described elsewhere (2). The pH of sericin concentrate obtained via nanofiltration (NF) was decreased from 6.1 to 3.8 by using acids (0.3% v/v). Alternatively, ethanol (75% v/v) was used to precipitate sericin. Samples into which precipitation agent was added, were centrifuged at 3.000 rpm for 10-20 min to obtain sericin as a pellet. The precipitated sericin was frozen and lyophilized.

Molecular weight distribution of sericin:

In order to determine molecular weight distribution of sericin, a Shimadzu Prominence Model HPLC system was used with a gel permeation chromatography (GPC) column (Nucleogel aqua OH-40-8) and a buffer solution containing 0.3 M NaCl and 0.05 M phosphate. The analyses were made at 30 °C and ultraviolet absorbances (UVA) were read at 230

nm. The flow rate of mobile phase was adjusted to 0.3 mLmin⁻¹ (21). A standard protein mixture containing cytochrome c monomer (12.4 kDa), myokinase (32 kDa), enolase (67 kDa), lactate dehydrogenase (142 kDa) and glutamate dehydrogenase (290 kDa) (Calbiochem) was used.

Moisture, ash and organic contents of recovered sericin:

Moisture content of sericin was determined by drying samples at 100 °C for 3 h followed by constant weight determination. To determine the organic and inorganic (ash) contents of sericin, samples dried at 105 °C were ignited at 600 °C for 90 min. To calculate the moisture content, the difference of initial and dry weights of cocoons were divided by the initial weights of cocoons.

Elemental composition of recovered sericin:

Elemental compositions of samples were determined in the Middle East Technical University Central Laboratory. The weight percents of carbon (C), hydrogen (H) and nitrogen (N) elements of sericin samples were determined on a dry basis using LECO CHNS-932 elemental analyzer. In this analysis, the instrument is heated to 1.000 °C and approximately 1 g of sample is placed inside a silver capsule, which is dropped into the furnace, where it is completely combusted. Infrared detection is used to measure the C and H, whereas N is measured using thermal conductivity detection.

Protein solubility:

The solubility of recovered sericin samples at various pH values was determined (22). Samples were poured into the centrifugation tubes and pH was adjusted to 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 and 11.0 with 1 M NaOH and 1 M HCl. The tubes were thoroughly shaken and centrifuged at 4.000 rpm for 10 min. Protein contents in the original sample and in the supernatant were determined

by the bichinchonic acid (BCA) protein protocol. In this way, the pH at which maximum sericin solubility occurs was determined. Protein solubility was calculated using the following equation (23-24):

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{\text{Protein content of the supernatant}}{\text{Total protein content in the sample}} \times 100$$

Total protein analysis:

Total protein analysis was carried out by using BCA protocol (25). It is a spectrophotometric method where copper-BCA mixture is added into the samples and these samples are incubated in water bath at 37 °C for 30 min. Thus, in an alkaline environment, Cu²⁺ ion is reduced to Cu⁺ ion as a result of the reaction of protein and copper. Then, color occurs in the samples with the composition of BCA-Cu⁺. In total protein analysis, UVA of the samples were read at 562 nm by using Hitachi model spectrophotometer and total protein concentrations were determined by the calibration equation, which was developed using reference sericin, SN.

Protein identification:

2-D gel electrophoresis and MALDI-TOF analyses were performed in Ankara University Biotechnology Institute Proteomics Laboratory. Firstly, recovered sericin sample, which was precipitated with ethanol, was passed through the ion exchange columns (anion and cation columns), which provides the separation of biomolecules relative to their charges. After passing through anion and cation columns, 2-D gel electrophoresis was performed so that all proteins in recovered sericin sample were separated in the gel according to their iso-electric points (pI) and their MWs. Then, each spot obtained in the gel was loaded into MALDI-TOF, and the spectrums of recovered sericin sample were compared with SWISS-PROT and ExPASy protein databases in order to identify sericin.

Amino acid analysis:

Amino acid composition of sericin samples were determined by the Food Institute of Marmara Research Center (MAM), Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK). A Shimadzu 20 Series Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) with UV detection was used. The method was adopted from literature and modified by TUBITAK MAM (26-27).

Dialysis:

Recovered sericin samples were dialyzed against ultrapure water in order to increase their purities. The molecular weight cut-off (MWCO) of dialysis sacks was 3.5 kDa (Serva). After sericin solutions were added into the dialysis sacks, the ends of sacks were closed and put into beakers filled with ultrapure water. These beakers were shaken in a water bath at 37 °C for 1-2 days. Then, sericin solutions in the dialysis sacks were analyzed by a high performance liquid chromatography (HPLC) with the method described in Section 2.3, except that flow rate of mobile phase was adjusted to 1.0 mLmin⁻¹.

RESULTS**Sericin yield of native cocoons and cocoon cooking wastewaters:**

In order to evaluate the sericin potential of native cocoons, the amount of sericin that can be obtained from the native cocoon shells (cocoons free from dead silkworms) was determined first. The effect of hydrothermal reaction time on sericin yield and the ethanol-precipitation efficiency were determined (Table 1). As seen, sericin yield, which was determined by dividing sericin residue by the dry weight of cocoon, increased from 0.222 g/g cocoon to 0.232 g/g cocoon as the reaction time increased from 1 h to 2 h, corresponding to 4.5% increase of sericin yield. Further increase of reaction time to 5 h resulted in sericin yield of 0.239 g/g cocoon, which indicates that five-fold increase of reaction time provided 7.7% increase of

sericin yield, which is slightly higher than the result obtained at 2 h.

Ethanol precipitation efficiency was determined by dividing the weight of sericin after ethanol-precipitation + lyophilization by the sericin residue. The reaction time had little effect on the ethanol precipitation efficiency, which increased from 66% to 72% with an increase of reaction time from 1 h to 2 h.

The sericin content of wastewater was also determined by quantitative analysis. Sericin concentration in cocoon cooking wastewaters (SW) sampled at different times ranged from 5043 mgL⁻¹ to 7957 mgL⁻¹, with an average of 6067 mgL⁻¹.

Table 1. Effect of hydrothermal reaction time on sericin yield and extraction efficiency

Parameter	Measured/calculated value		
	t=1 h	t=2 h	t=5 h
Initial weight of cocoon (g)	1	1	1
Dry weight of cocoon (g)	0.922	0.922	0.924
Moisture content (%)	8.5	8.5	8.2
Dry weight of cocoon after hydrothermal processing (g)	0.717	0.708	0.703
Sericin residue (g)	0.205	0.214	0.221
Sericin yield (g/g cocoon)	0.222	0.232	0.239
Weight of sericin after ethanol-precipitation + lyophilization (g)	0.135	0.154	-
Precipitation efficiency (%)	65.9	72.0	-
Overall extraction efficiency (%)	14.6	16.7	-

Molecular weight distribution of sericin:

In this study, MW was determined as 138 kDa and 124 kDa for commercial sericin (SC) and reference sericin (SN), respectively (Figure 1a-b). In the source wastewater, four MW fractions of sericin were

detected, which ranged from 10 kDa to 200 kDa at varying proportions (Figure 1c). They were named as SW1 (average MW 188 kDa, average fraction 15%), SW2 (average MW 80 kDa, average fraction 62%), SW3 (average MW 35 kDa, average fraction 6% and SW4 (average MW 18 kDa, average fraction 17% (Figure 2). On the other hand, only S2 (average MW 80 kDa, average fraction 100%) was detected in the recovered powder (Fig. 1d). This sample was obtained by adopting a process train consisting of nanofiltration+precipitation (NF+P) (28).

Since the source wastewater contained several silkworm proteins other than sericin, the final product also contained some impurities due to inadequate separation performance of the membrane technology adopted (28). This impurity, which is shown in Figure 1d, was identified as Actin cytoplasmic A3 protein at a ratio of 7.1%, and sericin constituted the remaining 92.9% of the protein powder (28). In order to further purify the protein powder, dialysis (D) was applied after NF+P process train, where precipitation of samples were carried out using different acids and ethanol. In samples obtained via NF+P+D process train, S2 (average MW 80 kDa, average fraction 80%) and S3 (average MW 44 kDa, average fraction 20%) were detected (Figure 1e).

The effect of dialysis step on the MW distribution of sericin is depicted in Figure 3. As seen, three different molecular weight ranges were found; S1 with MW of 151-176 kDa at a percentage of 0-12%, S2 with MW of 86-96 kDa at a percentage of 79-97%, and S3 with MW of 40-44 kDa at a percentage of 1-20%, respectively. Like in the source wastewater, S2 was the dominant sericin fraction in the recovered dialysed samples. All acids and ethanol gave almost same results with respect to MW distribution, except that S1 (biggest sericin polypeptides) was not detected in ethanol-precipitated sample. In terms of MW, the difference between dialysed and non-dialysed sericin samples was the loss of S4 (smallest sericin polypeptides having MW of 10-25 kDa). Although the reported MWCO of the dialysis sack was

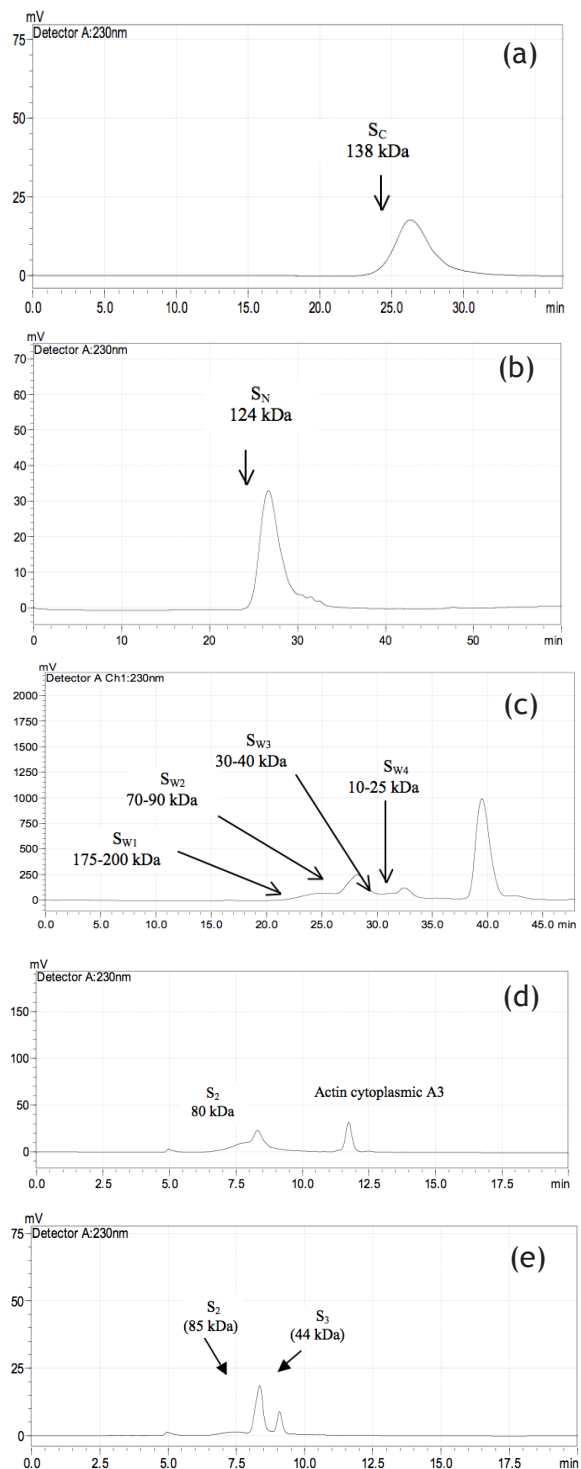


Figure 1. Molecular weight distribution of sericin in different samples

(a) S_C (b) S_N (c) S_W (d) S_R (e) S_{RD}

Table 2. MW comparison of sericin with literature

MW (kDa) reported in literature				MW (kDa) determined in this study			
(3)	(11)	(13)	(30)	S _C	S _N	S _W	S _R - S _{RD}
10-300	24-400	14-467	6-15	138	124	10-200	40-176

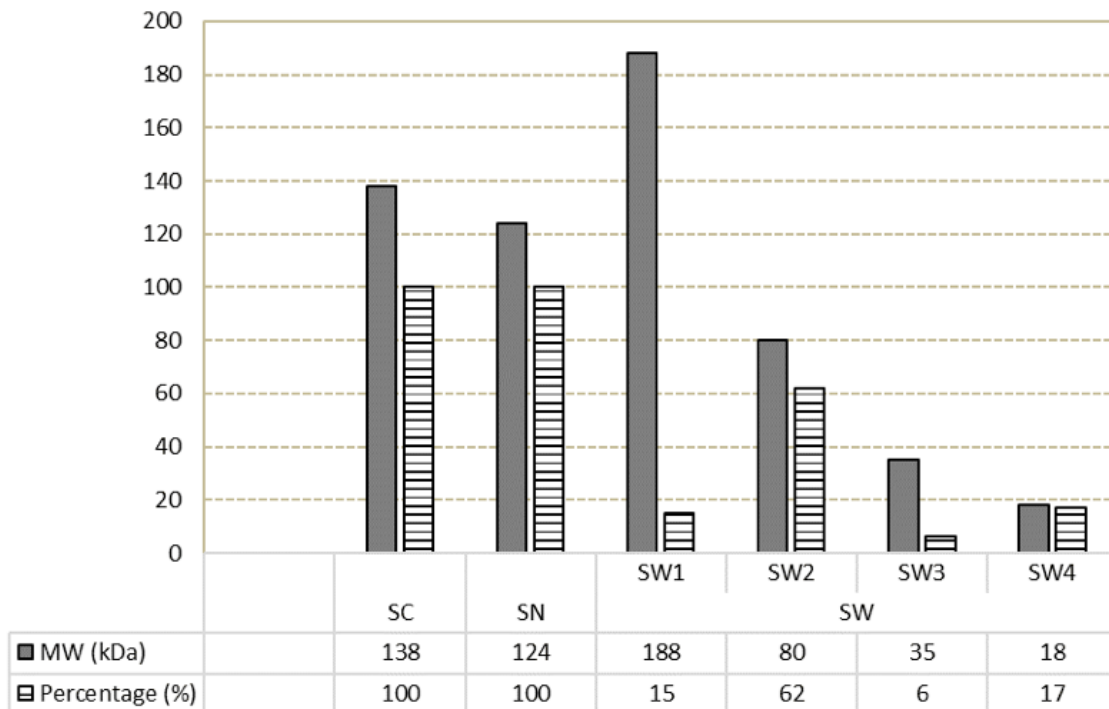
much smaller (3.5 kDa) than the MW of S4, it readily passed to the other side of the dialysis sack. This was attributed to possible degradation of S4 into much smaller peptides during dialysis since the protein is sensitive to operating temperature.

Moisture, ash and organic contents of sericin:

The pH, moisture, ash and organic contents of reference and recovered sericin samples were determined. As seen from Table 3, the pH of SN was measured as 7.1. On the other hand, the pH of SC was

Table 3. Comparison of pH, moisture and ash contents of sericin with literature

Parameter	Literature			This study		
	(3)	(13)	(30)	S _C	S _N	S _R
pH	-	7	5 - 7	3.9	7.1	4.1 - 7.7
Moisture (%)	8.2 - 9.0	-	≤ 5	7.4	8.6	2.8 - 3.9
Ash (%)	0.9 - 1.0	4.2	≤ 4	2.7	3.8	11.3 - 14.4

**Figure 2.** Average MW fractions of sericin in source wastewater (S_W)

measured as 3.9. The pH of recovered sericin varied from 4.1 to 7.7, where sericin precipitated with acids had acidic pH and that precipitated with ethanol had neutral pH. Among the acids used, nitric acid and sulfuric acid resulted in the lowest and highest pH values of 4.1 and 5.5, respectively (Figure 4).

The moisture contents of SC and SN were found as; 7.4% and 8.6%, respectively. On the other hand, the moisture content of recovered sericin changed between 2.8% and 3.9% (Table 3).

The ash contents of SC and SN were determined as; 2.7% and 3.8%, respectively (Table 3). On the other hand, the ash content of recovered sericin was determined as; 11.3-14.4%, where the lowest and highest values were obtained with nitric acid and ethanol, respectively (Figure 4). Among the acids used, sulfuric acid resulted in an ash content of 13.9, which was nearest to the ash content obtained by ethanol.

Identification of recovered sericin:

The 2-D electrophoresis and MALDI-TOF spectrums of protein spots revealed that recovered protein was compatible with SER1 (O96614) and SER2 (O96615). The pI of sericin was found as 5.9 for Sericin 1 and 4.8 for Isoform 1A of Sericin 1 (with accession number of P07856-2), where the latter lost during ethanol precipitation. The pictures of reference and recovered sericin samples are depicted in Figure 5. As seen, the color of sericin recovered with acid was brown whereas that of sericin recovered with ethanol was cream and the appearance was closer to that of reference sericin.

Elemental composition of sericin:

The elemental compositions of sericin samples are given in Figure 6 and comparison with literature is given in Table 4. As seen from Figure 6, carbon contents of commercial and reference sericin were 42.5% and 41%. On the other hand, carbon content of

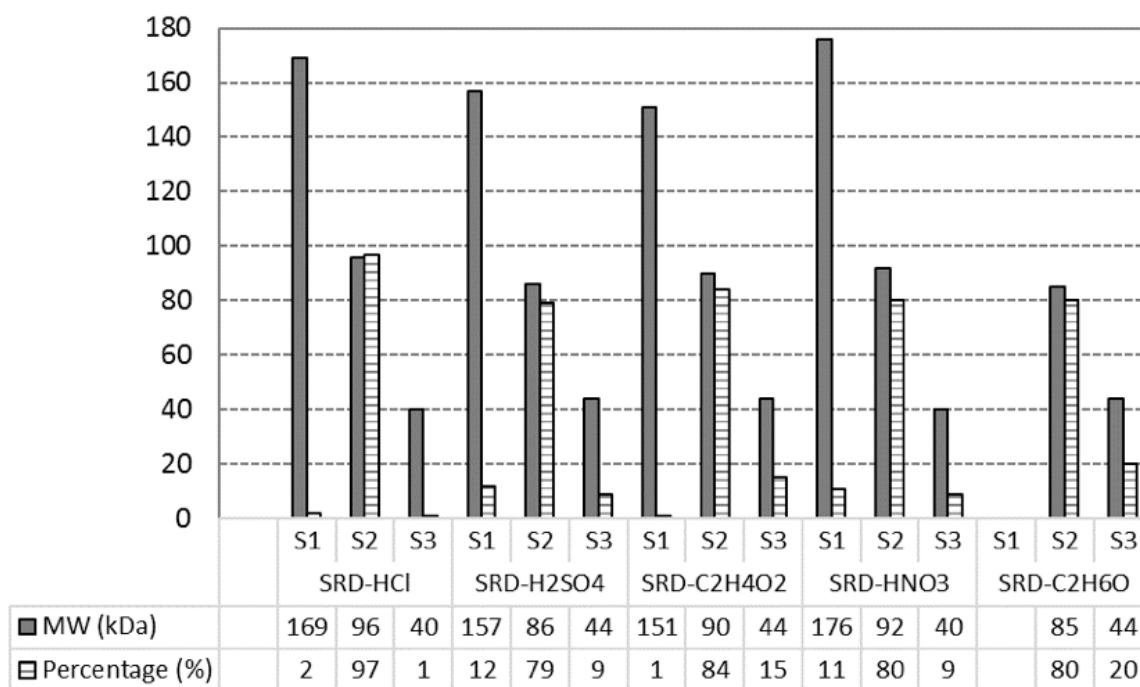


Figure 3. MW fractions of sericin samples precipitated with acids and ethanol prior to dialysis (SRD-HCl: recovered sericin precipitated with HCl and dialysed)

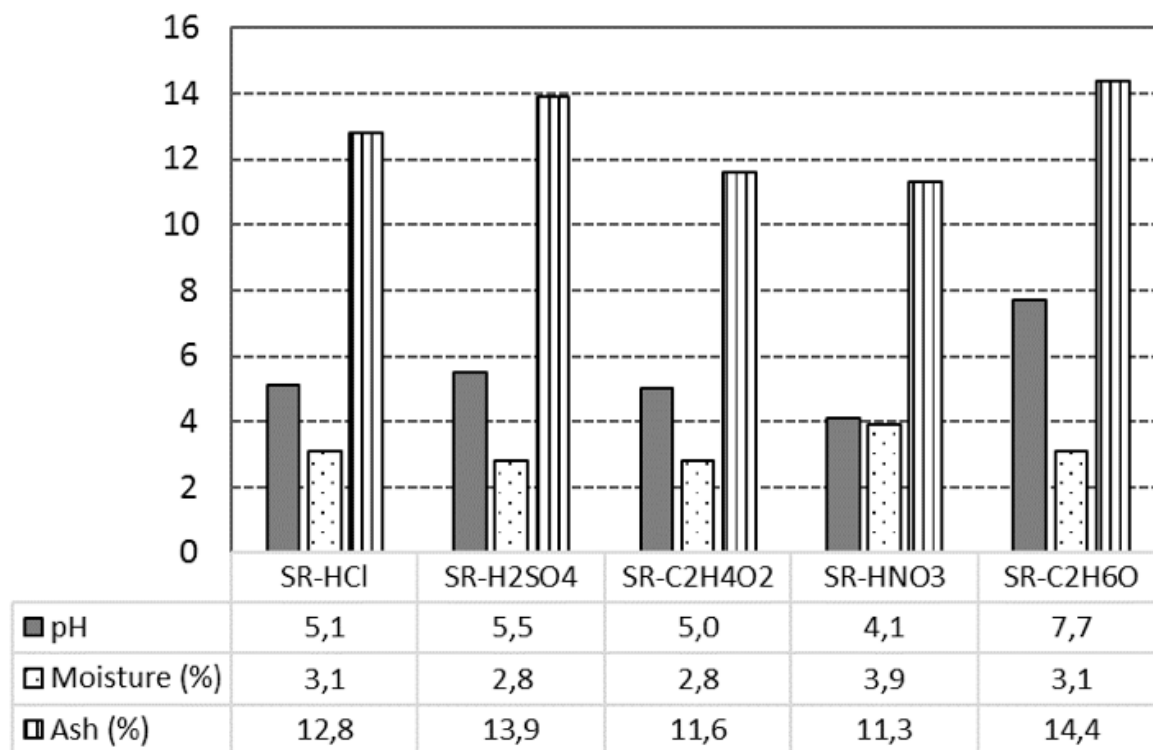


Figure 4. Effect of precipitation agent on pH, moisture and ash content of recovered sericin

recovered sericin was slightly lower. It changed from 36.7% to 40.3%, where the lowest value was obtained with nitric acid precipitation and the highest value was obtained with acetic acid precipitation.

The hydrogen contents of SC and SN were 6.4% and 6.2%, respectively (Figure 6). H content of samples increased up to 7.3% - 8.8% after dialysis. Regarding the nitrogen contents, N was determined as 13.9% and 14.9% for SC and SN, respectively. On the other hand, recovered sericin samples had lower N contents, i.e., 10.2-12.9%. The highest N content belonged to sericin precipitated with HNO₃, where additional N most probably originated from nitric acid. On the other hand, dialysed samples had higher N contents, i.e., 14.4% - 16.8% (Table 4).

In general, elemental composition of SC and SN were almost the same, with a total C+H+N content of 62.1% - 62.8%. The remaining portion was attributed to the presence of oxygen mainly, as seen from the

molecular formula of sericin (Figure 7) (34). Although recovered sericin, regardless of the precipitation agent used, had lower C+H+N content of 53.4% - 56.5%, the dialysed samples had higher C+H+N content of 64.8% - 70.9%, where the data closest to the standards used in this study and those reported in literature, were obtained by ethanol-precipitation.

Table 4. Comparison of elemental composition of recovered sericin with literature

Elemental composition	Literature			This study		
	(13)	(30)	(33)	S _C	S _N	S _R - S _{RD}
C (%)			48.3	42.5	41.0	36.7 - 45.3
H (%)			4.5	6.4	6.2	5.4 - 8.8
N (%)	14.7	≥ 14	11.9	13.9	14.9	10.2 - 16.8

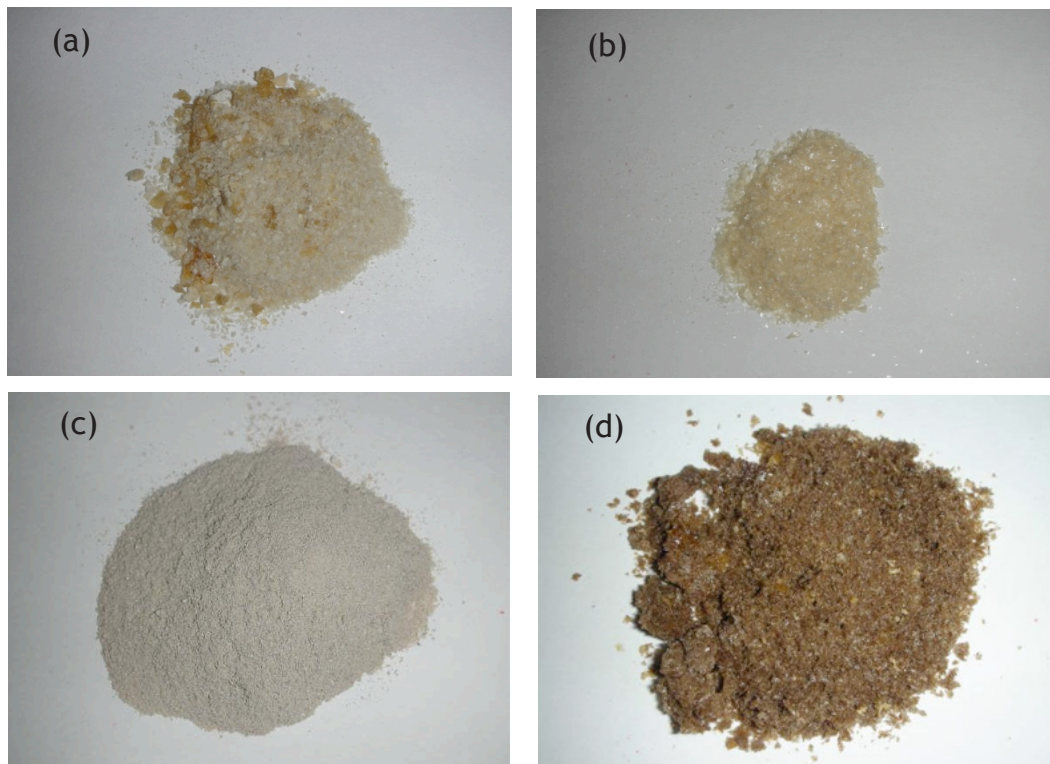


Figure 5. Pictures of (a) S_N (unground) (b) S_C (c) S_R (with ethanol) (d) S_R (with acid-HCl)

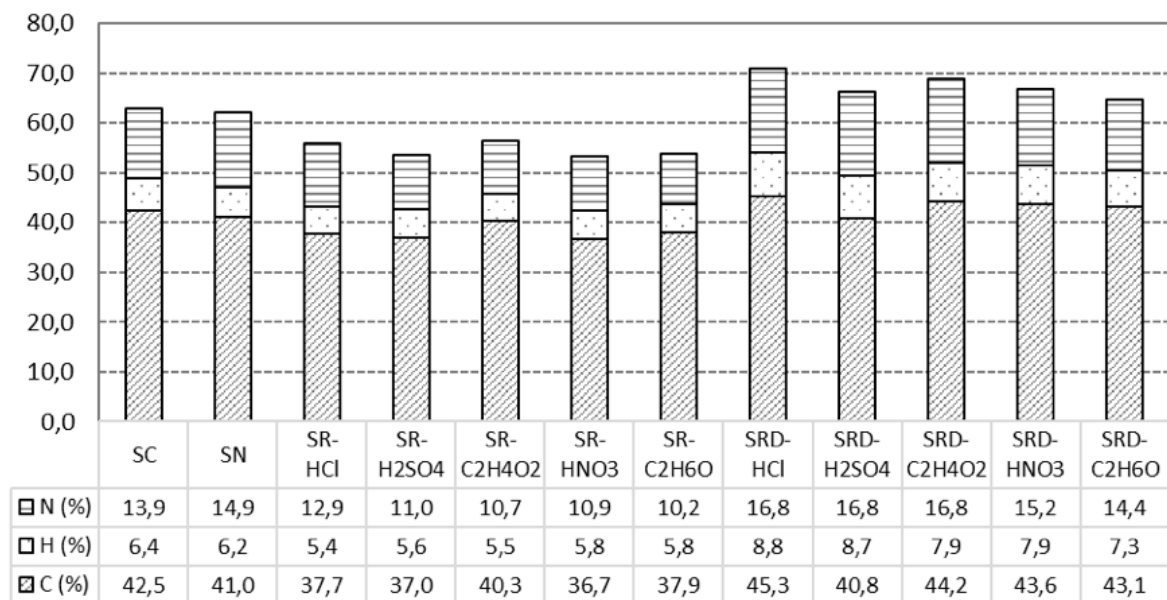


Figure 6. Elemental composition (dry basis) sericin



Figure 7. Structure of sericin polypeptide (34)

UV Absorbance of sericin:

The UV absorbance spectrum of reference and recovered sericin samples were determined by wavelength scanning from 220 nm to 300 nm (Figure 8). As shown, the maximal absorption wavelength was around 220 nm for all sericin samples, which is attributed to the absorbance by the peptide bonds. On the other hand, only the reference sericin SN showed another distinct peak at $\lambda=275$ nm, which is assigned to the aromatic amino acids absorption wavelength (13).

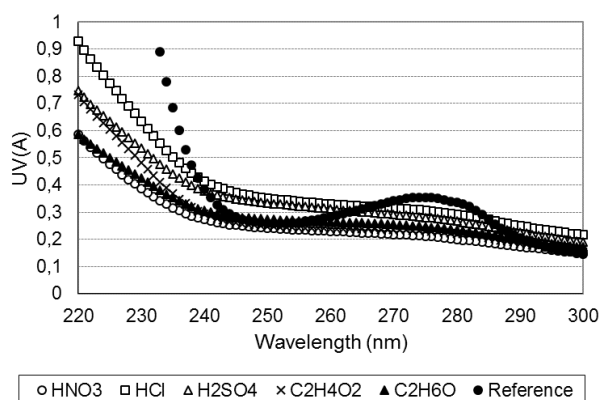


Figure 8. UV absorption spectrum of recovered (SR) and reference (SN) sericin

Amino acid composition of sericin:

Serine, aspartic acid and glycine content of commercial sericin and recovered sericin samples were determined as 56.22% and 48.86%, respectively (Table 5). Serine is the dominant amino acid in sericin, which was determined as 35.3% and 28.9% for SC and SR, respectively.

Solubility of recovered sericin:

As seen from Figure 9, solubility of sericin precipitated with acids was only 47-65% at pH 3, which increased to 59-88% at pH 7. The solubility of sericin increased for all the acids used when pH was increased from 3 to 11, where it reached 89-110%. On the other hand, solubility of sericin precipitated with ethanol was above 90% at all pH values. The reason for the solubility values which are above 100% may be that alkaline conditions enhance protein solubility.

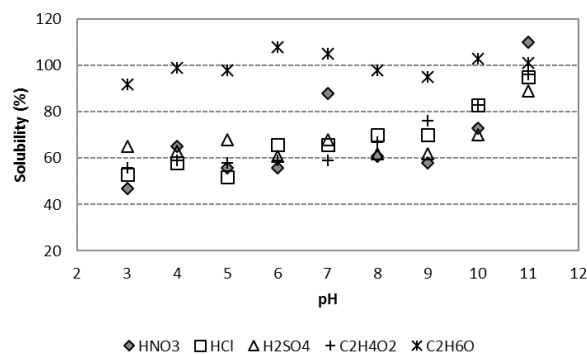


Figure 9. Effect of pH on the solubility of recovered sericin

DISCUSSION

The overall extraction efficiency of sericin from the native cocoon, which was determined by dividing the weight of sericin after ethanol-precipitation + lyophilization by the dry weight of cocoon, slightly increased from 14.6% to 16.7% as the time was increased from 1 h to 2 h. The water extraction efficiencies of sericin well agree with 14.3% reported in literature (29). Hence, it was decided to adopt a reaction time of 1 h throughout the study.

On the average 6 g of sericin could be obtained per liter of wastewater. Since sericulture is a seasonal activity in Turkey, cocoon cooking process is performed for about 80 days in a year, generating a total volume of 150 m³ of wastewater annually. This amount of wastewater would potentially yield 900 kg of sericin per year. A detailed research, which is

beyond the scope of this study, is required in order to determine the potential demand for sericin on local or global market.

In literature, sericin is reported as a family of proteins with a wide range of MW, i.e., 6-467 kDa (3, 11, 13, 30). This is due to the fact that molecular weight of sericin is affected by the factors such as pH, temperature and processing time (3). The MW fractions of recovered sericin were classified as high MW-sericin, which are suitable for making biomaterials and membranes (3). A comparison with literature revealed that MW of sericin varies significantly. The MW of sericin may be as low as 6 kDa or as high as

467 kDa based on the processing conditions (13, 30). This was well verified in this study; the range of sericin MW in the source wastewater changed from 10 kDa to 200 kDa, however it had a narrower range, which changed from 40 kDa to 176 kDa in the recovered samples (Table 2). This means the smallest and largest polypeptides were lost during processing. Nevertheless, S₂ was the dominant fraction in both source wastewater and the recovered samples.

The reason for recovered sericin having moisture contents lower than those of native (SN) and commercial sericin (SC) was attributed to possible loss of some amino acids during processing, which

Table 5. Comparison of amino acid compositions of sericin with literature

Amino acid	Literature (%)			This study (%)	
	(36)	(37)	(6)	S _C	S _R
Aspartic acid (Asp)	14.11	15.64	13.30	12.25	10.84
Threonine (Thr)	6.31	8.16	3.30	6.23	8.20
Serine (Ser)	21.67	33.63	39.00	35.33	28.97
Glutamic acid (Glu)	9.83	4.61	12.80	3.83	8.65
Glycine (Gly)	15.26	15.03	14.30	8.64	9.05
Alanine (Ala)	10.20	4.10	5.50	2.03	1.25
Cysteine (Cys)	0	0.44	nr	nr	nr
Valine (Val)	2.76	2.88	0.70	3.01	3.09
Methionine (Met)	0.53	3.39	nr	bdl	0.27
Isoleucine (Ile)	2.60	0.56	0.20	0.67	1.21
Leucine (Leu)	3.82	1.00	0.50	1.46	2.24
Tyrosine (Tyr)	2.08	3.45	0.70	5.88	4.03
Phenylalanine (Phe)	1.49	0.28	nr	0.58	1.25
Lysine (Lys)	3.02	2.35	5.40	1.80	3.66
Histidine (His)	1.55	1.06	1.00	2.33	2.79
Arginine (Arg)	3.96	2.87	2.90	12.91	8.37
Proline (Pro)	0.78	0.54	nr	2.11	3.81
cis-4-Hydroxy-D-proline (Hyp)	nr	nr	nr	0.72	2.15
Tryptophan (Trp)	nr	nr	nr	0.21	0.17
Total	99.97	99.99	99.60	99.99	100.00

nr: not reported, bdl: below detection limit

play functional role in moisture absorption. This was also verified via the amino acid analysis conducted.

The pH of SN, which was measured as 7.1 agrees well with the range of 5-7 reported in literature (13, 30). On the other hand, the pH of SC, measured as 3.9 was lower than those reported in literature. Since SN was produced in our laboratory without any pH change, it is expected to have neutral pH. However, the recovery method of SC is unknown as it was a commercial product obtained from abroad through a local supplier. So, the lower pH of SC was attributed to the recovery method applied, which was probably conducted at acidic pH. The pH of recovered sericin, which varied from 4.1 to 7.7 was also similar to literature findings (13, 30).

The moisture contents of SC and SN were slightly higher than $\leq 5\%$ reported by the commercial supplier (30), but quite close to 9% and 8.2% reported by Zhang (3) for cocoon and silk yarn, respectively. On the other hand, the moisture content of recovered sericin, which changed between 2.8% and 3.9% was lower than those of SC and SN, but very close to those reported by a commercial supplier (30) (Table 3).

The ash contents of SC and SN were slightly higher than the values reported in literature (3). In a study in which the thermal properties of silk fibers were examined, this content was reported as 0.9% and 1.0% after the ignition of cocoon and silk yarn, respectively, at 550 °C for one night (3). The reason for this difference may be the ignition of different materials, that is, sericin-rich protein powder was ignited in this study whereas cocoon shell made of sericin and fibroin was ignited by Zhang (3). The ash contents of sericin and fibroin may differ, resulting in different values. On the other hand, the ash contents of SC and SN were quite close to those of 3-4% reported for pure sericin by the commercial retailer (30) and Wu et al. (13). Sericin ash possibly contained a little salt, as the inorganic content of cocoon includes calcium, potassium, sulphur, phosphorus, silicon and magnesium (31). The ash content of recovered sericin was much higher than those of SC and SN,

whis means that the organic content of recovered sericin was slightly lower. This was attributed to the fact that recovered powder was a sericin-rich product rather than pure sericin so the presence of other silkworm protein in the recovered sample might have contributed to the higher ash content of recovered sericin.

The pl of sericin agreed with the pl values of 5.0 and 4.3 reported for silk fiber (32) and protein purified from the cocoon shell of silkworm (8). The color difference between sericin samples recovered with ethanol and acids was attributed to the dilution of sericin solution due to addition of ethanol at higher volumes.

Regarding the elemental compositions, the reason for lower C contents of recovered sericin as compared to the standards can be explained in two ways; first, the recovered powder contained another silkworm protein as an impurity, second, the processes applied in the textile industry to remove sericin from the silk fiber and the processes applied in our laboratory to recover sericin from wastewater might have caused loss of some amino acids, resulting in lower carbon contents. The dialysis results suggest that the first reason is more likely, because when dialysis was applied to purify sericin, C content of samples increased up to 40.8% - 45.3%, which are closer to the C contents of commercial and reference sericin used in this study, as well as to the carbon content of 48.3% reported by Chen et al. (33). Comparing the precipitation agents, highest C content was obtained with acetic acid. The reason for this was attributed to the likely presence of additional carbon coming from acetic acid, which might have bound to the protein during precipitation.

The hydrogen content of recovered sericin was slightly lower than those of SC and SN, however it was very similar to the value of 4.5% reported Chen et al. (33). Nitrogen content of SC and SN were almost the same with 14.0% and 14.7% reported by Wu et al. (13) and a commercial retailer (30). On the other hand, recovered sericin samples had lower N

contents. The highest N content belonged to sericin precipitated with HNO₃, where additional N most probably originated from nitric acid. On the other hand, dialysed samples had higher N contents, i.e., 14.4% - 16.8%, which are closer to the standards and literature findings (13, 30).

Proteins generally have two absorbance peaks in the UV region, one between 215-230 nm, where peptide bonds absorb, and another at about 280 nm due to light absorption by aromatic amino acids. Similarly, the silk sericin shows a peak absorbance at around 280 nm of wavelength (35). The UV absorbance spectrum of reference and recovered sericin samples showed that the maximal absorption wavelength was around 220 nm for all sericin samples, which is attributed to the absorbance by the peptide bonds. On the other hand, only the reference sericin SN showed another distinct peak at $\lambda=275$ nm, which was assigned to the aromatic amino acids absorption wavelength (13). This result showed that peptide bonds were the major absorbing group for recovered sericin in the ultraviolet region, and indicates the loss of some aromatic amino acids in recovered sericin samples to some extent, as verified by amino acid analysis. This is indeed quite expected, because the proteins are subject to degradation during processing.

The amino acid composition of recovered sericin was compared with literature. There are slight differences in amino acid compositions due to different processing techniques used as well as the degradation of the protein. Serine, aspartic acid and glycine content of sericin samples reported in literature count for more than 50% of the whole amino acid composition, i.e., 51.04%, 64.30% and 66.60% were determined by Takasu et al. (6), Wu et al. (36) and Aramwit et al. (37). In this

study, serine, aspartic acid and glycine content of commercial sericin and recovered sericin samples were determined as 56.22% and 48.86%, respectively. Serine is the dominant amino acid in sericin, which was determined as 35.3% and 28.9% for SC and SR, respectively. These values are quite compatible with those reported in literature, i.e., 21.7% (36), 33.6% (37) and 39.0% (6). These results reveal that amino acid composition of recovered sericin, despite the loss of some amino acids, is quite acceptable as compared with literature.

The results obtained for the solubility of recovered protein showed that ethanol may be better than acids for precipitation considering the end-use of recovered sericin. Sericin precipitated with acids would necessitate the adjustment of pH to basic conditions for achieving complete solubility. This would limit the applicability of recovered sericin in some industries or require additional processing steps. On the other hand, complete solubility of sericin recovered with ethanol at all pH values would provide significant benefits.

CONCLUSIONS

Sericin recovered from cocoon cooking wastewaters of textile industry was characterized in terms of MW, pH, moisture, ash, elemental analysis, amino acid analysis and protein solubility. Sericin recovered from the source wastewater had acceptable quality; where its properties were similar to the commercial and reference sericin used in this study, as well as those reported in literature. With a serine content of almost 29%, recovered sericin holds the potential of high moisture absorption and is a promising raw material for potential applications in biomedical, cosmetics and pharmaceuticals industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) for the financial support via Grant No. 106 M 062 and the British Council for the financial support via Scientific Partnership Program. The authors also acknowledge Prof. Dr. Ülkü Yetiş for financing the amino acid analysis. Assoc. Prof. Dr. Duygu Demiralp is also gratefully acknowledged for performing the protein identification study.

REFERENCES

1. Masahiro S, Hideyuki Y, Norihisa K. Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats. *Nutr Res*, 2000; 20: 1505-11.
2. Capar G, Aygun SS, Gecit MR. Treatment of silk production wastewaters by membrane processes for sericin recovery. *J Membr Sci*, 2008; 325: 920-31.
3. Zhang YQ. Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. *Biotechnol Adv*, 2002; 20: 91-100.
4. Kato N, Sato S, Yamanaka A, Yamada H, Fuwa N, Nomura M. Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998; 62: 145-7.
5. Oh H, Lee JY, Kim MK, Um IC, Lee KH. Refining hot-water extracted silk sericin by ethanol-induced precipitation. *Int J Biol Macromol*, 2011; 48: 32-7.
6. Takasu Y, Yamada H, Tsubouchi K. Isolation of three main components from the cocoon of the silkworm, *bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002; 66: 2715-18.
7. Dash R, Mukherjee S, Kundu SC. Isolation, purification and characterization of silk protein sericin from cocoon peduncles of tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Int J Biol Macromol*, 2006; 38: 255-8.
8. Kurioka A, Kurioka F, Yamazaki M. Characterization of sericin powder prepared from citric acid-degraded sericin polypeptides of the silkworm, *bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004; 68: 774-80.
9. Zhang YQ, Tao ML, Shen WD, Mao JP, Chen Y. Synthesis of silk sericin peptides-L-asparaginase bioconjugates and their characterization. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006; 81: 136-45.
10. Dash R, Ghosh SK, Kaplan DL, Kundu SC. Purification and biochemical characterization of a 70 kDa sericin from tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2007; 147: 129-34.
11. Kundu SC, Dash BC, Dash R, Kaplan DL. Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications. *Prog Polym Sci*, 2008; 33: 998-12.
12. Lamoolphak W, De-Eknamkul W, Shotipruk A. Hydrothermal production and characterization of protein and amino acids from silk waste. *Bioresource Technol*, 2008; 99: 7678-85.
13. Wu J, Wang Z, Xu SY. Preparation and characterization of sericin powder extracted from silk industry wastewater. *Food Chem*, 2007; 103: 1255-62.
14. Wu JH, Wang Z, Xu SY. Enzymatic production of bioactive peptides from sericin recovered from silk industry wastewater. *Process Biochem*, 2008; 43: 480-7.
15. Vaithanomsat P, Kitpreechavanich V. Sericin separation from silk degumming wastewater. *Sep Purif Technol*, 2008; 59: 129-33.
16. Anghileri A, Lantto R, Kruus K, Arosio C, Freddi G. Tyrosinase catalyzed grafting of sericin peptides onto chitosan and production of protein-polysaccharide bioconjugates. *J Biotechnol*, 2007; 127: 508-19.
17. Cortez J, Anghieri A, Bonner PLR, Griffin M, Freddi G. Transglutaminase mediated grafting of silk proteins onto wool fabrics leading to improved physical and mechanical properties. *Enzyme Microb Technol*, 2007; 40: 1698-04.

18. Fabiani C, Pizzichini M, Spadoni M, Zedditia G. Treatment of wastewater from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. *Desalination*, 1996; 105: 1-9.
19. Capar G, Aygun SS, Gecit MR. Separation of sericin from fatty acids towards its recovery from silk degumming wastewaters. *J Membr Sci*, 2009; 342: 179-89.
20. Kodama K. The preparation and physico-chemical properties of sericin. *Biochem J*, 1926; 20: 1208-22.
21. Ogino M, Tanaka R, Hattori M, Yoshida T, Yokote Y, Takahashi, Interfacial behavior of fatty-acylated sericin prepared by lipase-catalyzed solid phase synthesis. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 66-75.
22. Wu U, Hettiarachchy S, Qi M. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *J Am Oil Chem Society*, 1998; 75: 450-845.
23. Were L, Hettiarachchy NS, Kalapathy U. Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. *J Food Sci*, 1997; 62: 821-3.
24. Chove BE, Grandison AS, Lewis MJ. Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloid*, 2007; 21: 1379-88.
25. Krieg RC, Dong Y, Schwamborn K, Knuechel R. Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. *J Biochem Bioph Meth*, 2005; 65: 13-9.
26. Dimova N. RP-HPLC analysis of aminoacids with UV-detection. *Bulg Acad Sci*, 2003, 56: 75-8.
27. Gheshlaghi R, Scharer JM, Moo-Young M, Douglas PL. Application of statistical design for the optimization of aminoacids separation by reverse-phase HPLC. *Anal Biochem*, 2008; 383: 93-2.
28. Capar G. Separation of silkworm proteins in cocoon cooking wastewaters via nanofiltration: effect of solution pH on enrichment of sericin. *J Membr Sci*, 2012; 389: 509-21.
29. Tao W, Li M, Xie R. Preparation and structure of porous silk sericin materials. *Macromol Mater Eng*, 2005; 290: 188-94.
30. Huzhou Aotesi Biochemical, <http://www.silk-protein.com/silk-sericin.html>, last date of access: December 2014.
31. American Society of Agricultural and Biological Engineers (ASABE), Thermal properties and inorganic composition of silk fiber. <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=9235&t=2&redir=&redirType=>. (last date of access: December 2014.)
32. Mondal M, Trivedy K, Kumar SN. The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., - a review. *Caspian J Environ Sci*, 2007; 5: 63-76.
33. Chen X, Lam KF, Mak SF, Yeung KL. Precious metal recovery by selective adsorption using biosorbents. *J Hazard Mater*, 2011; 186: 902-10.
34. Morrison RT, Boyd RN. *Organic Chemistry*. 6th ed., Prentice Hall, 1992.
35. Kim SJ. Gas permeation through water-swollen sericin/PVA membranes. Master Thesis, University of Waterloo, Ontario, Canada, 2007.
36. Wu MH, Yue JX, Zhang YQ. Ultrafiltration recovery of sericin from the alkaline waste of silk floss processing and controlled enzymatic hydrolysis. *J Clean Prod*, 2014; 76: 154-60.
37. Aramwit P, Siritientong T, Kanokpanont S, Srichana T. Formulation and characterization of silk sericin-PVA scaffold crosslinked with genipin. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47: 668-75.

Anjiimmünoblastik T-hücreli lenfoması olan bir hastada çoklu ilaç dirençli *Corynebacterium mucifaciens*'in neden olduğu ölümcül bir sepsis olgusu

A fatal case of sepsis caused by multidrug-resistant *Corynebacterium mucifaciens* in a patient with an angioimmunoblastic T cell lymphoma

Fatma KÖKSAL-ÇAKIRLAR¹, Nevriye GÖNÜLLÜ¹, Mert KUŞKUCU¹, Kübra CAN¹,
Seval ÜRKMEZ², Kenan MİDİLLİ¹, Nuri KIRAZ¹

ÖZET

Amaç: Son yıllarda *Corynebacterium* türleri fırsatçı patojenler olarak dikkat çekmeye başlamıştır. *Corynebacterium mucifaciens* deri, kan ve diğer steril vücut sıvılarından izole edilmiştir. 1997'de tarif edildiğinden bu yana nadiren insan patojeni olarak bildirilmiştir. Bu yazıda febril nötropeni ve septik şok ön tanısı ile İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sadi Sun Yoğun Bakım Ünitesinde takibe alınan anjiimmünoblastik T-hücreli lenfoma tanısı almış 58 yaşında bir erkek olgu sunulmaktadır. Kan kültüründe üreyen Gram pozitif çomak şeklinde bakterilerin identifikasyonu Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) otomatize identifikasyon sistemi kullanılarak yapılmıştır ve 16S rRNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bakterinin antibiyotik MİK değerleri E test ile saptanmıştır ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Hastadan alınan 4 kan kültür örneğinde saf olarak Gram pozitif çomak şeklinde üreyen bakteri, *C. mucifaciens* olarak tanımlanmıştır. Bakteri kökeninden elde edilen 16S rRNA dizisi, GenBank veri bankası ile yapılan karşılaştırmada *C. mucifaciens* ile uyumlu bulunmuştur. Bakterinin E test ile yapılan antibiyotik MİK değerleri seftazidim, klindamisin, azitromisin ve klaritromisin için >256 µg/mL, sefotaksim ve siprofloksasin için 32 µg/mL, penisilin, ampisilin ve sefepim için 16 µg/

ABSTRACT

Objective: In recent years, *Corynebacterium* species has attracted attention as opportunistic pathogens. *Corynebacterium mucifaciens* has been isolated from skin, blood and other sterile body fluids. It has been rarely reported as human pathogens, since it was described in 1997. In this study, a 58 years old male patient who has a medical history of angioimmunoblastic T-cell lymphoma, taken to the Sadi Sun Intensive Care Unit in I.U. Cerrahpaşa Medical Faculty Hospital with the preliminary diagnosis of febrile neutropenia and septic shock was reported. The identification of Gram-positive rod-shaped bacteria isolated in blood cultures was performed by using the Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) automated identification system and was confirmed by 16S rRNA sequence analysis. Bacterial antibiotic MIC values were determined by E-test and evaluated according to EUCAST criteria. Gram-positive rod-shaped bacteria which were isolated from 4 blood culture samples taken from the patient, were identified as *C. mucifaciens*. The 16S rRNA gene sequence which obtained from the bacteria was matched with *C. mucifaciens* sequences in GenBank database. Antibiotic MIC values with E test were determined as; >256 µg/mL for ceftazidime, clindamycin, azithromycin, and clarithromycin, 32 µg/mL for cefotaxime and ciprofloxacin, 16 µg/mL for

¹ İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

² İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İSTANBUL



İletişim/Corresponding Author : Fatma KÖKSAL-ÇAKIRLAR

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

Tel : +90 543 673 0296

E-posta/ E-mail : fzkoksalt@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 07.02.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 04.05.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.58224

Köksal-Çakırlar F, Gönüllü N, Kuşkucu M, Can K, Ürkmez S, Midilli K, Kiraz N. Anjiimmünoblastik T-hücreli lenfoması olan bir hastada çoklu ilaç dirençli *Corynebacterium mucifaciens*'in neden olduğu ölümcül bir sepsis olgusu. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 235-40.

mL, imipenem için 6 µg/mL, piperasillin+tazobaktam için 8 µg/mL, amoksisilin+klavulanik asit için 3 µg/mL, tobramisin için 0,16 µg/mL, amikasin için 1,25 µg/mL ve teikoplanin için 2 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Vankomisin (MİK, 1 µg/mL) ve gentamisin (MİK, 0,16 µg/mL) *C. mucifaciens*'e etkili ilaçlar olarak bulunmuştur. Hasta yapılan tüm müdahalelere rağmen septik şok ve çoklu organ yetersizliği nedeniyle kaybedilmiştir. *C. mucifaciens* immün-yetmezlik öyküsü olan hastalarda önemli bir insan patojeni olarak düşünülmemelidir.

Anahtar Kelimeler: *Corynebacterium mucifaciens*, Sepsis, Kan akım enfeksiyonu

penicillin, ampicillin and cefepime, 6 µg/mL for imipenem, 8 µg/mL for piperacillin + tazobactam, 3 µg/mL for amoxicillin + clavulanic acid, 0.16 µg/mL for tobramycin, 1.25 µg/mL for amikacin and 2 µg/mL for teicoplanin, respectively. Vancomycin (MIC, 1 µg/mL) and gentamycin (MIC, 0.16 µg/mL) were found to be the effective antibiotics against *C. mucifaciens*. Despite all of the interventions performed patient passed away due to septic shock and multiple organ failure. *C. mucifaciens* should be considered as an important human pathogen in patients with history of immunodeficiency.

Key Words: *Corynebacterium mucifaciens*, Sepsis, Bloodstream infection

GİRİŞ

Uzun yıllar boyunca, klinik örneklerden izole edilen *Corynebacteria*'ların klinik olarak önemli olup olmadığı klinik mikrobiyologlar arasında tartışma konusu olmuştur. Bu organizmalar deri kontaminantları olarak göz ardı edilmiş ve tür seviyesinde tanımlanmaları için pek çaba gösterilmemiştir. Ancak, bağışıklık sistemi bozulmuş ya da ciddi hastalığı olan hastaların klinik örneklerinden fırsatçı patojenler olarak giderek artan sıklıkla izole edilmeleri, bu bakterilerin önemli insan patojeni olarak kabul görmesine neden olmuştur (1). *Corynebacterium mucifaciens* ilk kez 1997 yılında yeni bir *Corynebacterium* türü olarak önerilmiştir (2). Bu bakteri genellikle kandan ya da diğer steril vücut sıvılarından izole edilmektedir (1). *Corynebacterium* sp. ile enfekte olduğu bilinen hastaların tedavisinde genellikle ampirik tedavi yapılmaktadır. Bazı yayınlarda *C. jeikeium* gibi birkaç istisna dışında tüm *Corynebacterium* türleri için penisilin veya vankomisin iyi klinik yanıt gösterdiği bildirilmiştir (3, 4). *C. mucifaciens* vakalarında ise beta-laktam antibiyotiklerin ve aminoglikozitlerin daha iyi etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (5).

Bu olgu sunumunda *C. mucifaciens*'in neden olduğu düşünülen septik şok ve çoklu organ

yetersizliği nedeniyle kaybedilen anjiyoimmünoblastik T-hücreli lenfomalı 58 yaşında bir erkek hasta sunulmaktadır.

OLGU

2010 yılında "anjiyoimmünoblastik T hücreli lenfoma" tanısı alan 58 yaşında erkek hastanın, dört kür kemoterapi sonrası tedaviye refrakter kabul edilerek günde 8 mg prednol tedavisine devam edildi. Bu süreçte Cytomegalovirus retinitine bağlı sol gözde körlük gelişmiştir. 3,5 yıl sonra hasta ateş, boğaz ağrısı ve karın ağrısı şikayetleriyle dış merkezde KBB uzmanına başvurmuş ve hastaya kriptik tonsilit tanısı ile seftriakson ve klindamisin tedavisi başlanmıştır. Antibiyotik tedavisine rağmen şikâyetlerinin düzelmemesi ve genel durumunun kötüleşmesi üzerine İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Acil Dahiliye polikliniğine başvurmuştur. "Nekrotizan kriptik tonsilit" ön tanısı ile hastadan iki adet hemokültür ve idrar kültürü alınarak mikrobiyolojik incelemeye gönderildi. Enfeksiyon hastalıkları konsültasyonu sonrası karbapenem ve piperasilin-tazobaktam tedavisi başlanan hasta septik şok ve febril nötropeni tanısıyla Sadi Sun Yoğun Bakım Ünitesine yatırıldı. Şuuru açık ve koopere

olan hastaya solunum sıkıntısı nedeniyle non-invazif mekanik ventilasyon (NİMV) başlandı. Santral ven kateteri takılarak sıvı resüsitasyonuna devam edildi. Hipotansiyon devam ettiği için vazoaktif ajan infüzyonu başlandı. Anemisi olan hastaya 2 ünite eritrosit süspansiyonu verildi. Tedaviler sonrası KAH: 103/dk, Kan basıncı: 120/60 mmHg oldu (Tablo 1). Santral ven oksijen satürasyonu (ScVO₂) %83, laktat değeri 1,8 idi. Ateş 38,6 °C olan hastada kreatinin değeri yüksek olması nedeniyle böbrek doz ayarlaması yapılarak karbapenem ve piperasilin-tazobaktam tedavisine devam edildi. Hematoloji konsültasyonu sonrası nötropenik olan hastaya neupogen tedavisi eklendi. On saat sonra NIMV desteği altında hipoksemisi devam eden hasta entübe edilerek mekanik ventilasyon tedavisine başlandı. Entübasyon sırasında bilateral tonsiller hipertrofik ve üzerinin beyaz renkli membran ile kaplı olduğu görülerek tonsil üzerinden sürüntü, endotrakeal aspirat (ETA) ve iki kan kültürü daha alınarak mikrobiyolojik incelemeye gönderildi. ETA'da Gram boyasında bol lökosit görülmüş, bakteri tespit edilmedi. Kültürde 5000 cfu/ml *Candida albicans* üremiştir.

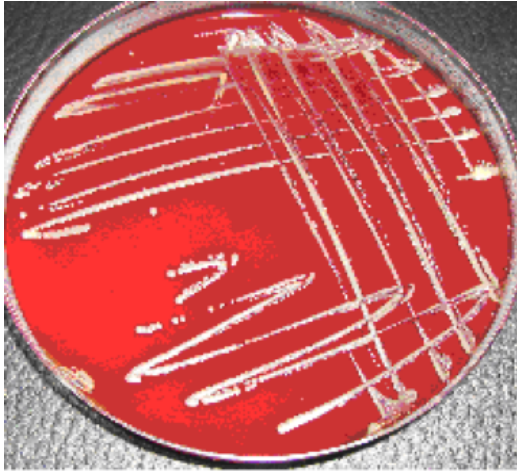
Table 1. Laboratuvar ve klinik bulguların seyri

	1. gün	2. gün	3. gün
Lökosit (mm ³)	610	540	1700
PNL (%)	29,6	37	57
CRP (mg/L)	291	320	399
Ateş(OC)	38,6	38,9	40,7
LDH (IU/L)	1296	1371	-
Kreatinin (mg/dL)	2,1	2,3	2,5
İdrar miktarı (mL)	3000	2000	1000
Kan basıncı (mmHg)	120/60	100/50	80/40
SVB (mmHg)	9	14	14
ScVo ₂ (%)	83	86	84
Laktat (mmol/L)	1,8	2,7	2,7

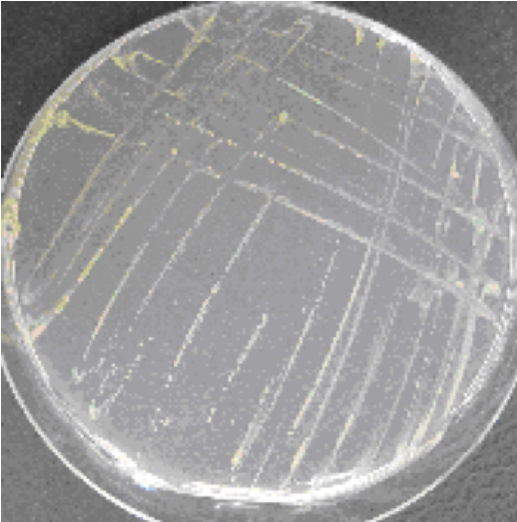
PNL : Polimorfo nükleer lökosit CRP : C-reaktif protein
 LDH : Laktat dehidrojenaz SVB : Santral Venöz Basıncı
 ScVo₂ : Santral venöz oksijen satürasyonu

İkinci gün noradrenalin dozunun artırılmasına ve sıvı resüsitasyonuna rağmen hipotansiyonu devam eden, ateşi (38,9 °C) antipiretik tedavi ile düşmeyen ve CRP değeri artan hastaya enfeksiyon hastalıkları konsültasyonu sonrası flukonazol tedavisi eklendi. Üçüncü gün ateş 39,7- 40,7 °C arasında seyretti ve enfeksiyon hastalıkları uzmanı tarafından pnömoni dışlanamadığı için ve klinik bulguların kötüye gitmesi nedeniyle piperasilin-tazobaktam yerine vankomisin tedavisine, flukonazol yerine cansidas tedavisine geçildi. Üçüncü günün sonunda hasta septik şok ve çoklu organ yetersizliği nedeniyle kaybedildi. Hastanın idrar kültüründe üreme olmadı. Dört kan kültüründe (BACTEC 9120, Becton Dickinson, ABD) de Gram pozitif, sporsuz, difteroid çomak şeklinde bakteriler üredi. Bakteriler koyun kanlı plak ve çukulatamsı plak besiyerinde 48 saat inkübasyondan sonra düz, hafif sarımsı, mukoid koloniler oluşturdu (Resim 1, 2). Katalaz pozitif, üre, glukoz, maltoz, sukroz ve nitrat testleri negatifti. Üreyen bakteri Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD) otomatize idendifikasyon sistemi kullanılarak *C. mucifaciens* olarak tanımlandı. Eş zamanlı olarak bakterinin 16S rRNA bölgesinin yaklaşık 1200 bp kısmı DNA dizi analizi ile analiz edildi. Gen bankasında yapılan karşılaştırmada bakteri *C. mucifaciens* dizileri ile eşleşti ve elde edilen dizi <http://bioinfo.unice.fr/blast/> web adresi 16S rRNA veri tabanında online karşılaştırmaya tabi tutuldu. Aynı paket içerisinde yer alan Blast2 Tree paketi ile filogenetik karşılaştırma yapıldı (Şekil 1).

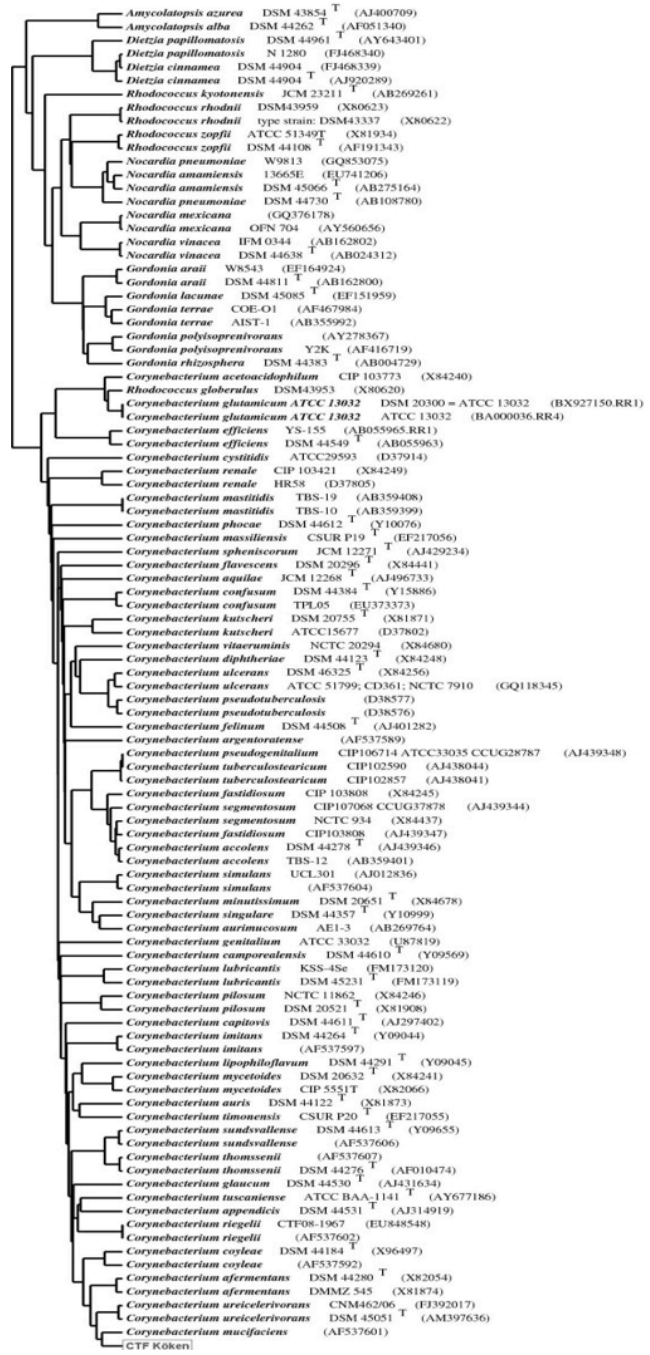
İzole ettiğimiz *C. mucifaciens*'in antimikrobiyal duyarlılığını saptamak için ampirik tedavi için çoğunlukla kullanılan antimikrobiyallerin MİK değerleri E test ile saptandı ve *Corynebacterium* spp. için European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) sınır değer tablosunda yer alan antibiyotiklerin MİK değerleri EUCAST kriterlerine göre belirlendi (6). EUCAST sınır değer tablosunda yer almayan diğer antibiyotiklerin duyarlılık kategorisi belirlenmemiştir. MİK değerleri seftazidim, klindamisin, azitromisin ve klaritromisin için >256 µg/mL, sefotaksim ve



Resim 1. *C. mucifaciens*'in koyun kanlı agarda kolonileri



Resim 2. *C. mucifaciens*'in Mülller Hinton agarda hafif sarımsı kolonileri



Şekil 1. İzolatın 16 S rRNA gen dizilerinin filogenetik ağacı

siprofloksasin için 32 µg/mL, penisilin, ampicilin ve sefepim için 16 µg/mL, imipenem için 6 µg/mL, piperasillin+tazobaktam için 8 µg/mL, amoksisilin+klavulanik asit için 3 µg/mL, tobramisin için 0,16 µg/mL, amikasin için 1,25 µg/mL ve

teikoplanin için 2 µg/mL olarak tespit edilmiştir. *Corynebacterium* spp. EUCAST kriterlerine göre *C. mucifaciens*'in penisilin, siprofloksasin ve klindamisine dirençli, vankomisin (MİK, 1 µg / mL) ve gentamisine (MİK, 0,16 µg / mL) duyarlı olduğu bulunmuştur.

TARTIŞMA

Corynebacterium'ların tür düzeyinde tanımlanmasında sorunlar vardır. Son zamanlarda, moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesiyle yeni *Corynebacterium* türleri keşfedilmiş ve eski türler de yeniden adlandırılmıştır (7). *C. mucifaciens* yeni tarif edilen genellikle hafif sarı ve mukoid koloni oluşturan, kanlı agar da üreyen bir türdür. İdentifikasyon standart biyokimyasal testler ya da ticari tanımlama sistemleri ile yapılmaktadır. Ancak, yakın ilişkili türlerin ayrımı 16S rRNA gen dizi analizi gibi moleküler biyoloji teknikleri ile gerçekleştirilmektedir. *C. mucifaciens* kan kültürleri, eklem sıvısı ve yara sürüntüsü gibi insan çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiştir (1, 2, 4, 8, 9). Bizim olgumuzda anjioimmünoblastik T-hücreli lenfoma tanısı almış 58 yaşında bir erkek hastanın 4 kan kültüründe de *C. mucifaciens* üremiştir. Ancak kan kültürlerinin sonuçları çıkmadan hasta kaybedilmiştir.

C. mucifaciens ile oluşan olgularda beta-laktam antibiyotiklerin ve aminoglikozidlerin iyi bir aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Funke ve arkadaşları (1) *C. mucifaciens*'in aminoglikozidlere ve glikopeptidlere (teikoplanin ve vankomisin) iyi aktivite sergilediğini, penem, kinolon, makrolid ve klindamisine direnç gösterdiğini bildirdiler. Antibiyotiklere duyarlılık *C. mucifaciens* izolatları arasında değişiklik göstermektedir. Bu nedenle şüpheli patojenler için duyarlılık testi tavsiye edilmektedir. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Corynebacterium* türlerinin klinik örneklerinden fırsatçı patojenler olarak giderek artan sıklıkla izole edilmeleri nedeniyle 2010 yılında penisilin, vankomisin, gentamisin ve eritromisin için duyarlılık sınır değerlerini belirleyen bir döküman (CLSI, M45A2) yayınlamıştır (10) Bu dökümanda *Corynebacterium* türlerinin (özellikle *C. jeikeum* ve *C. urealyticum*) beta-laktam, makrolid ve aminoglikozidleri içine alan çoklu ilaç direncine sahip oldukları belirtilmiştir. EUCAST, 2014 kriterlerinde *Corynebacterium* türleri için penisilin, siprofloksasin, moksifloksasin, gentamisin, vankomisin, klindamisin, tetrasiklin, linezolid ve rifampisin için duyarlılık

sınır değerleri yer almıştır (11). *Corynebacterium* spp. için EUCAST, 2015 kriterlerinde ise duyarlılık sınır değerlerinde bir değişiklik olmamıştır (6). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document M100-S25, 2015 kriterlerinde *Corynebacterium* spp. henüz yer almamıştır. Coryneform bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili kapsamlı çalışma çok az yapılmıştır. Diğer bazı çalışmalar da *C. jeikeum* ve *C. urealyticum* gibi türler üzerinde odaklanmıştır. Bu bakteriler arasında da antibiyotik direncinin giderek arttığı gösterilmiştir (12). *Corynebacterium* spp'ler (ve bu yazıda tarif edilen *C. mucifaciens*) için in vitro ve in vivo çalışmalar yetersizdir. Hastalara genellikle ampirik tedavi verilmektedir. Bu olguda da *Corynebacterium* spp. için EUCAST sınır değer tablosunda bulunmayan karbapenem ve piperasilin-tazobaktam hastaya ampirik olarak başlanmıştır. Ancak Enfeksiyon Hastalıkları konsültasyonu sonrası pnömoni dışlanamadığı için ve klinik bulguların kötüye gitmesi nedeniyle piperasilin-tazobaktam yerine vankomisin tedavisine geçilmiştir. Ampirik tedavide kullanılan antimikrobiyaller sık rastlanan bakterilere göre seçilmektedir. Biz bu olgu sunumunda ampirik olarak verilebilen antibiyotiklerin MİK değerlerini tespit etmeye çalıştık. EUCAST kriterlerinde yer almayan seftazidim (MİK >256 µg/mL), sefotaksim (MİK >32 µg/mL), sefepim (MİK >16 µg/mL), ve ampisilinin (MİK >16 µg/mL) MİK değeri gradient testin kapsama aldığı en yüksek MİK değerine yakın hatta bu değeri geçmektedir. Bu nedenle etkili olamayacağı düşünülmüştür. Bizim bakterimizde MİK değeri imipenem için 6 µg/ml, piperasilin+tazobaktam için 3 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Hasta bu antimikrobiyallerle tedaviye cevap vermemiştir. Bu nedenle standartlarda yer almayan antimikrobiyaller *Corynebacterium* spp. enfeksiyonlarının tedavisi için uygun bir seçim olmadığı görülmektedir. EUCAST'te *Corynebacterium* türleri için eritromisinin sınır değeri yoktur, ancak klindamisin (≤0,5 duyarlı ve >0,5 dirençli) için vardır. CLSI (M45A2)'de ise klindamisin için sınır değeri olmamasına rağmen eritromisinin MİK sınır değeri >2 dirençli olarak verilmiştir.

Bizim çalışmamızda makrolidler (klindamisin, azitromisin ve klaritromisin) >256 µg/ml MİK değeri ile dirençli olarak değerlendirilebilir. İzole ettiğimiz *C. mucifaciens* EUCAST kriterlerine göre siprofloksasine dirençli, gentamisine duyarlıdır. EUCAST sınır değer tablosunda bulunmayan tobramisin (0,16 µg/mL) ve amikasinin (1,25 µg/mL) MİK değeri gradient testin kapsama aldığı en düşük MİK değerine yakındır. Bu nedenle duyarlı kabul edilebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, birden fazla kan kültürü şişesinde coryneform bakteri üremişse, hastanın bakteriyemi ile uyumlu belirtileri varsa ve başka hiçbir patojen mikroorganizma mevcut değilse, üreyen *Corynebacteria*'ların tür düzeyinde tanımlanması önerilmektedir (1). Doğru tanımlanma ve MIC değerlerinin belirlenmesi *Corynebacterium*

spp.'lerin ve ilişkili türlerin patojenik potansiyelini daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır. Bu bakterilerle ilgili çalışmalar arttıkça daha fazla antibiyotigin sınır değerleri kriterlerde yerini alacaktır. Bu nedenle daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim olgumuzda, anjiyoimmünoblastik T-hücreli lenfoması olan, febril nötropeni ve septik şok gelişen bir hastadan *C. mucifaciens* izole edildi. Hasta kan kültür sonuçları çıkmadan kaybedilmiştir.

Özetle biz bu yazıda anjiyoimmünoblastik T-hücreli lenfoması olan bir hastanın kan kültüründen izole ettiğimiz *C. mucifaciens* ile gelişen septik şok ve çoklu organ yetersizliği nedeniyle meydana gelen bir eksitus olgusunu tarif ettik. *C. mucifaciens* immün-yetmezlik öyküsü olan hastalarda önemli bir insan patojeni olarak düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

1. Funke G, Lawson PA, Collins MD. *Corynebacterium mucifaciens* sp.nov., an unusual species from human clinical material. Int J Syst Bacteriol, 1997; 47: 952-7.
2. Bernard KA, Munro C, Wiebe D, Ongansoy E. Characteristics of rare or recently described *Corynebacterium* species recovered from human clinical material in Canada. J Clin Microbiol, 2002; 40: 4375-81.
3. Weiss K, Laverdière M, Rivest R. Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species by broth microdilution and disk diffusion methods. Antimicrob Agents Chemother, 1996; 40: 930-3.
4. Cantarelli VV, Brodt TC, Secchi C, Inamine E, Pereira Fde S, Pilger DA. Fatal Case of Bacteremia Caused by an Atypical Strain of *Corynebacterium mucifaciens*. Brazil J Infect Dis, 2006; 10(6): 416-8.
5. Funke G, Bernard KA. Coryneform Gram-positive rods. In: Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. Manual of clinical microbiology, 7th ed. Washington DC, ASM Press, 1999: 319-45.
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.
7. Taylor D, Daulby A, Grimshaw S, James G, Mercer J, Vaziri S. Characterization of the microflora of the human axilla. Int J Cosm Sci, 2003; 25: 137-45.
8. Morinaka S1, Kurokawa M, Nukina M, Nakamura H. Unusual *Corynebacterium mucifaciens* isolated from ear and nasal specimens. Otolaryngol Head Neck Surg, Morinaka S1, Kurokawa M, Nukina M, Nakamura H. Otolaryngol, 2006; 135: 392-6.
9. Djossou F1, Bézian MC, Moynet D, Le Flèche-Matéos A, Malvy D. *Corynebacterium mucifaciens* in an immunocompetent patient with cavitory pneumonia. BMC Infect Dis, 2010; 10:355.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria-Second Edition: Approved Guideline M45-A2. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014.
12. Camello TCF, Mattos-Guaraldi AL, Formiga LCD, Marques EA. Nondiphtherial *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Microbiol, 2003; 34: 39-44.

Tarım çalışanlarının bitki koruma ürünleri konusunda bilgi ve davranışları

Knowledge and behavior of agricultural workers about the plant protection products

Ersin USKUN¹

ÖZET

Bitki koruma ürünleri doğru kullanılmadıklarında halk sağlığı ve çevre üzerine olumsuz etkilere neden olabilirler. Bu çalışmada tarım çalışanlarının bitki koruma ürünleriyle ilgili bilgi ve davranışları dünyadaki ve Türkiye'deki çalışmalarda bildirilen bulguların ışığında derlenmiştir. Yapılan çalışmalarda standart bir form kullanılmadığından değerlendirmelerin farklı başlıklarla ya da sorularla yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmaların birçoğunda tarım çalışanlarının bitki koruma ürünlerini kullanma, zamanlama, ilaç seçimi ve doz belirlemede karar verirken kimden bilgi ya da öneri aldıkları, ürünü uygun dozda kullanıp kullanmadıkları, tarım ürünlerinde bitki koruma ürünü ile ilgili kalıntı kaygısı yaşayıp yaşamadıkları ve bu kaygı için neler yaptıkları, ürünleri hangi koşullarda sakladıkları, ürün üzerindeki kullanım talimatlarını okuma ve uygulama durumları, uygulama sırasında kişisel koruyucu donanım (maske, eldiven, özel giysi) kullanıp kullanmadıkları, ilaçlama sırasında ya da sonrasında sağlık sorunu yaşayıp yaşamadıkları ve yaşıyorlarsa ne tür şikayetlerinin olduğu, kullanılmış boş ürün ambalajlarını nasıl bertaraf ettikleri sorgulanmıştır. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre; tarım çalışanlarının büyük çoğunluğu ürün uygulama zamanına kendisi karar vermekte (%30-80), kullanacağı ürünü ve dozunu

ABSTRACT

When the plant protection products are not used properly, they may have adverse effects on public health and environment. In this study, the knowledge and behavior of agricultural workers about the plant protection products in the light of findings that have been reported in the studies performed in Turkey and the world were reviewed. Since there was no standard form used in these studies, assessments were seen to be made through different titles or questions. In most of the studies from whom did the agricultural workers receive knowledge or recommendation for making decision about use of the plant protection products, timing, pesticide selection and dosage definition; whether the product is used at proper dose; or not whether they were concerned about residue of pesticides on the products and what did they do about this concern; in which circumstances were they storing the products, whether they read and implement the instruction on the products; whether they were using personal protective equipment (mask, glove, special wear) during the spraying, whether they experienced health problems during or after the agricultural spraying and, if yes what kind of complaints they had and how were they disposing the used empty products packages. According to the results of these studies; majority of the agricultural workers (30-80%) decide

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, ISPARTA



İletişim / Corresponding Author : Ersin USKUN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, ISPARTA

Tel : +90 246 211 36 33

E-posta / E-mail : ersinuskun@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 14.04.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 07.11.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.54872

Uskun E. Tarım çalışanlarının bitki koruma ürünleri konusunda bilgi ve davranışları. Türk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 241-54.

kendisi belirlemekte (%45), ürünün önerilen dozuna uymamakta ve yüksek dozda ürün uygulamaktadırlar (%18-30). Bir kısmı tarım ürünleri üzerindeki kalıntı sorununu önemsememekte ve uygulama yaparken bu durumu dikkate almamakta (%9-32), ürünün uygulama sonrası bekleme sürelerine uymamaktadırlar (%4-68). Tarım çalışanları bitki koruma ürünleri ile ilgili korunma ve hijyen kurallarına yeterince uymamaktadır (uygulama sonrası el yıkama %60-100, tüm vücut temizliği yapma %33-91). Kişisel koruyucu donanım kullanımı (%31-93) düşüktür. Ürünlerin kullanımı sırasında veya sonrasında, akut etkilenim belirtileri yaygın (%20-70) olarak görülmektedir. Boş ürün ambalajları uygun şekilde bertaraf edilmemekte, çevreye rasgele bırakılmakta (%3-80), bazen de yeniden kullanılmaktadır (%2-11). Uygulama sırasında bir kısım tarım çalışanlarının çevreyi ve çevredeki evcil hayvanları dikkate almaması (%85-90) da endişe vericidir. Tarım alanında çalışan bireylerin bitki koruma ürünlerinin kullanımıyla ilgili doğru bilgi, tutum ve davranış geliştirmelerini sağlamak amacıyla, daha çok eğitime, davranış değişikliği sağlayacak programlara ve denetime gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Tarım, çalışanlar, çalışan sağlığı, bitki koruma ürünleri, pestisit, bilgi, tutum, davranış.

the timing of product application by themselves; defined the pesticide and dosage themselves (45%); they did not comply to the recommended dosage and they used high doses of pesticides (18-30%). Some of them ignored the issue of residual pesticides on the products and neglect this during the application (9-32%) and; mostly (4-68%) did not comply to the waiting period following the application. Agricultural workers did not sufficiently follow the protection and hygiene rules (washing hands after application: 60-100% and taking a shower after application: 33-91%) regarding plant protection products. Rate of personal protection equipment usage was low. Symptoms of acute exposure was commonly (20-70%) seen during or after product usage. Empty product packages were not properly disposed, randomly left to environment (3-80%) and sometimes used again (2-11%). It was also of concern that some of them (85-90%) did not take into account environment and surrounding animals. Further training, programs and supervisions are needed in order to workers in the agriculture field correct knowledge, attitudes and behavior development regarding the use of pesticides.

Key Words: Agriculture, employees, employee health, plant protection products, pesticides, knowledge, attitude, behaviour.

GİRİŞ

Tarım alanlarının, erozyon, nüfus artışı, sanayi bölgelerinin yaygınlaşması gibi nedenlerle giderek daralması, yeni tarım alanlarının açılmaması ve bunlara ek olarak toprak veriminin giderek azalması ile paralel dünyada beslenme sorunlarının ve açlığın her geçen gün artarak devam etmesi, az alanda daha çok verim elde edilmesine yönelik politikaların oluşturulmasını zorunlu kılmıştır. Tarım alanlarının veriminin artırılmasının önündeki önemli engellerden biri olarak görülen zararlılarla mücadele etmek,

kaliteli tarımsal ürün elde etmek, ürünü çeşitli hastalıklardan ve yabancı otların zararlarından korumak amacıyla pestisit olarak da bilinen bitki koruma ürünlerinin kullanımı sıklıkla tercih edilen bir mücadele şekli olmuştur.

Bu derlemede, konuyla ilgili temel bilgilerin sunumunun ardından tarım çalışanlarının bitki koruma ürünleriyle ilgili bilgi tutum ve davranışları literatürdeki çalışmaların bulgularından yararlanılarak derlenecektir.

Tarihçe

Pestisitlerin kullanımı çok eskilere kadar gitmektedir. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. Bilinen ilk pestisit Mezopotamya'da yaklaşık 4500 yıl önce antik Sümer'de kullanılan elemental kükürt tozudur. 15. yüzyılda arsenik, cıva ve kurşun gibi toksik kimyasallar tarım ürünlerindeki zararlıların öldürülmesinde kullanılmışlardır. 17. yüzyılda nikotin sülfat, insektisit olarak kullanılmak üzere tütünden ekstrakte edilmiştir. 19. yüzyılda iki doğal pestisit kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri krizantemden elde edilen pyrethrum (pire otu) ve diğeri de tropik bitki köklerinden elde edilen rotenondur (1). Pestisitlerin yaygın olarak kullanılmaya başlanması 19. yüzyılın son dönemlerine rastlar. Özellikle İkinci Dünya Savaşı sonrasında hastalık, zararlı ve yabancı otların kimyasal savaşımı konusunda önemli ilerlemeler görülmüştür (2).

Tanım

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) pestisitleri; "insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı; gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin veya hayvan yemlerinin, üretimi, işlenmesi, taşınması, depolanması ve/veya pazarlanması sırasında, bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlının önlenmesi, yok edilmesi veya kontrol altına alınması amacıyla veya hayvanlar üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek zararlıların kontrol altına alınması amacıyla kullanılan maddelerdir" şeklinde tanımlamaktadır. Bu tanım, ayrıca bitki büyümesini düzenleyici, yaprak dökücü, kurutucu veya meyve seyreltici veya ham meyvelerin dökülmesini önleyici etkenleri ve depolanma ve taşınma sırasında ticari malların bozulmasını önlemek amacıyla hasat öncesi ve sonrası ürüne uygulanan maddeleri de kapsamaktadır (3). Bu kapsamlı tanımdan anlaşıldığı üzere pestisitler tarım alanında kullanımlarının yanı sıra tarımsal olmayan alanlarda

(örneğin kereste koruma, demiryollarının korunması, ağaç hamuru ve selüloz endüstrisinde, büro okul hastane vb. yaşam alanlarında böceklerle mücadelede, çim, bahçe ve golf alanlarının bakımında, sinek ve sivrisinek kontrolü amacıyla), endüstriyel alanlarda (halı vb. ürünlerin böcek ve güvelerden korunması, kağıt ambalaj ürünlerinin korunması amacıyla, endüstriyel amaçlı veya soğutucu sularda bitkilerin ve yosunların üremesini engellemek amacıyla), halk sağlığı alanında da (sıtma kontrolü, filaryazis, onikoserkozis, şistozomiyazis, tripanomiyazisde) kullanılmaktadır (4).

Bitki koruma ürünleri, ülkemizdeki mevzuatta "kullanıcıya farklı formlarda sunulan, bitki ve bitkisel ürünleri zararlı organizmalara karşı koruyan veya bu organizmaların etkilerini önleyen, bitki besleme amaçlı olanlar dışında bitki gelişimini etkileyen, koruyuculara ilişkin özel bir düzenleme kapsamında bulunmayan ancak, bitkisel ürünleri koruyucu olarak kullanılan, istenmeyen bitki veya bitki kısımlarını yok etmek, istenmeyen bitki gelişimini kontrol etmek veya önlemek amacıyla kullanıcıya bir veya daha fazla aktif madde içeren bir formülasyon halinde sunulan aktif madde ve preparatlar" olarak tanımlanmıştır (5).

Kullanım

Bitki koruma ürünlerinin dünya çapında kullanımının %55'i Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da gerçekleşmektedir. Avrupa Birliği ülkelerinde tarım ilacı kullanım miktarı en yüksek olan ülke hektar başına yaklaşık 10 kg. ile Hollanda'dır (6, 7). Türkiye'deki bitki koruma ürünlerinin tüketimi, AB ülkelerinininki ile kıyaslandığında, birim alan olarak hektara ürün miktarı bakımından oldukça geridedir. Yıllık tüketim miktarı hektara 400 - 700 gr. civarındadır (8). Ürün kullanım miktarları bakımından, Danimarka'ya göre 2, Yunanistan'a göre 9, Hollanda'ya göre 21 kat daha az ürün tüketilmektedir (9). Ancak, ülkemizin oldukça heterojen bir bitki koruma ürünü tüketimi olduğu unutulmamalıdır (7). Özellikle tarımda verimi

artıracak tüm olanakların (sulama, gübreleme, kaliteli tohum kullanma ve makineleşme) kullanıldığı entansif tarım yapılan Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerimizdeki bitki koruma ürünü kullanımının gelişmiş ülkeler düzeyine yaklaştığı bildirilmektedir (10).

Sınıflama

Pestisitler, hedefledikleri türler veya kimyasal özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılırlar. Hedef türlere göre sınıflandırıldığında pestisitler; insektisit (böcek öldüren), akarisit (akarları öldüren), nemasit (nematodları öldüren), mollussitit (yumuşakçaları öldüren), rodentisit (kemirgenleri öldüren), avisit (kuşları öldüren), afisit (yaprak bitlerini öldüren), fungusit (fungusları öldüren), bakterisit (bakterileri öldüren), herbisit (otları öldüren), algisit (algleri öldüren) olarak sınıflandırılırlar. Kimyasal yapılarına göre sınıflandırıldıklarında pestisitler; organoklorürlü pestisitler (DDT, BHC), organofosforlu pestisitler (paration, klorprifoz), karbamatlı pestisitler (metomil, Karbaril), herbisit asitler, üre herbisitler (dinuron, linuron), S-triazinler (atrazin, simazin), piretiroidler (deltametrin, sipermetrin) ve diğerleri (organociva ve kalay bileşikleri) olarak sınıflandırılmaktadır (11). Pestisitlerin burada belirtilenler dışında farklı sınıflandırmaları da bulunmaktadır.

Bitki Koruma Ürünlerinin Çevre ve Canlılar Üzerine Etkileri

Tarımda pestisitlerin kullanılması nedeniyle hava, toprak ve su zamanla kirletilmektedir. Pestisitler uygulandıkları alanlardan fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak rüzgar, yağmur gibi etkenlerle başka yerlere sürüklenerek çevre sorunlarına neden olmaktadır. Pestisitler buharlaşarak atmosferde kalıcı toksik madde birikimine sebep olabilirler ve/veya fotokimyasal yolla parçalanarak toksik veya toksik olmayan maddelere dönüşebilirler. Toprakta tutulup, toprak içinde kimyasal ve mikrobiyolojik parçalanmaya uğrayarak toprağı kirletebilir ve hatta yağmur, sel ve kar suları ile topraktan sürüklenerek,

nehir, göl ve deniz sularını da kirletebilirler. Bu sebeple pestisitler, doğal besin zincirinde yer alan tüm canlıların hayatını tehdit etmektedir (12).

Tarımsal alanlara, orman veya bahçelere uygulanan pestisitler havaya, su ve toprağı, oradan da bu ortamlarda yaşayan diğer canlılara geçerek dönüşüme uğrar. Hedef olmayan diğer organizma ve bitkilere ulaşabilir ve bunlarda kalıntı ve toksisiteye neden olabilir. Tedbirli kullanılmadıklarında, doğal biyolojik zararlı kontrol mekanizmalarına da zarar verir ve bunun sonucu olarak çok daha güçlü zararlıların saldırılarına, daha ağır kimyasalların uzun süre kullanımına ve artmış sağlık etkilerine sebep olabilir (13). İnsanların yakın çevresinde bulunan ve insanlara yarar sağlayan büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanları üzerinde de olumsuz etkilere sahiptir. Hayvanlarda da insanlarda olduğu gibi, akut ve kronik etkilere neden olurlar. Pestisitlerin, çiftlik hayvanlarının yağ, süt, et ve yumurta gibi ürünlerinde birikebileceğı göz ardı edilmemelidir (11). Su kaynaklarına geçerek içme sularını ve insanların besin zincirinde yer alan hayvan türlerini (örneğin balık) kontamine edebilir ki bu durum pestisitlerin sekonder halk sağlığı etkilerine yol açar (14).

Bitki Koruma Ürünlerinin Sağlık Etkileri

Dünyada her yıl istenmeyen (kasıtsız) zehirlenmeler nedeniyle yaklaşık 355 000 kişi yaşamını kaybetmektedir. Bunların 2/3'ü gelişmekte olan ülkelerde meydana gelmekte ve çoğunluğu toksik kimyasalların aşırı miktarda kullanımı veya uygun olmayan kullanımı sonucu oluşmaktadır (15).

Pestisitlerin oluşturduğu sağlık etkileri akut ve kronik olmak üzere iki başlık altında incelenebilir (13). Akut maruz kalım, irritasyondan, dermatite, sistemik emilime bağlı olarak ölüme kadar değişen tablolarla sonuçlanabilir. Belirtiler nonspesifiktir ve gastroenterit, soğuk algınlığı, nezle vb. hastalıklarla karıştırılabilir. Mesleki nedeni ölümlerin büyük çoğunluğu ise toksisitesi çok yüksek olan pestisitlere (parathion ve methamidophosa) maruz kalıma bağlıdır. Tarımsal kesimde çalışanlar diğer

endüstriyel sektörlerde çalışanlara göre daha yüksek risk altındadır (16). Solunum ve kardiyovasküler sistem hastalığı olanlar pestisit etkilenimine daha duyarlıdır. Astımı veya şiddetli alerjisi olanlar da daha yüksek tepki düzeyine sahiptir.

Kronik maruz kalım daha çok meslekle ilişkilidir ve özellikle kimyasalların kullanıldığı veya depolandığı tarım alanlarında ya da yakınında yaşayan ve düşük sosyoekonomik seviyeye sahip erkek, kadın ve çocuklar risk altındadır (17, 18). Uzun dönem pestisitlere maruz kalım gelişimsel, üreme, immün sistem, endokrin ve sinir sistemi fonksiyonlarının bozulması ile ilişkili hastalıklar ve kanser gelişimi için artmış risk oluşturur (19). Çocuklar erişkinlere göre daha yüksek risk taşır. Kronik etkiler kanser, doğum defektleri, nörotoksite, nörodavranışsal bozukluklar, nörofizyolojik değişiklikler, üreme ve fertilité üzerindeki etkiler olarak sıralanabilir.

Ayrıca Non-Hodgkin lenfoma, lösemi, multiple myeloma, karaciğer kanseri, testis kanseri, sterilite, beyin kanseri, akciğer kanseri için de riski artırdığı belirlenmiştir. Pestisitler özellikle gebeliğin ilk üç ayında maruz kalındığında embriyotoksite veya fetotoksite gösterebilir. Bazı organofosfat pestisitler uzun ve geniş çaplı lifleri tutan gecikmiş nöropatiye neden olabilir. Demiyelinizasyona bağlı olarak kas zayıflığı, üst ekstremitelere göre daha şiddetli olarak etkilenen alt ekstremitelerin felciyle sonuçlanabilir. Eski çalışmaların çoğu organofosfor pestisitlerin ağır mental ve psikolojik değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Küçük dozlarda bile psikoz semptomlarında ağır alevlenmelere neden olabildiği gösterilmiştir. Ayrıca bellek, psikolojik durum ve düşünme yeteneğinde önemli azalmaların olduğu görülmüştür (19).

Tarım Çalışanlarının Bitki Koruma Ürünlerine Maruz Kalım Yolları

Pestisitlerle insanların teması, yanlış ürün kullanımı dışında, ürünün üretimi, taşınması, depolanması, kullanılması ve ürün kalıntısı içeren tarım ürünlerinin

tüketimi sırasında olmaktadır. Bu etkileşim sonunda insan vücuduna ağız, deri ve solunum yoluyla girebilirler. Yaygın kullanılan insektisit, fungusit ve herbisitlere maruz kalmanın ilk yolu deri emilimidir. Normal maruz kalım düzeylerinde olan emilimlerde deri hasarı veya diğer belirtiler fark edilmeyebilir. Deri yoluyla maruz kalım yapılan işle uyumludur. Eller hemen her durumda maruz kalırken, tüm vücut ancak püskürtme ile uygulama sırasında maruz kalabilir. Karıştırma, yükleme ve elle püskürtmede ön kol, gövde ve yüzün maruz kalımı yaygındır. Seralarda veya sık aralıkla bitki ekilmiş alanlarda, yeni ürün uygulanmış yapraklarla bacakların temas etmesi ile de deri yoluyla maruz kalım olabilir. Uçucu bileşiklere sera gibi kapalı alanlarda çalışma sırasında solunum yoluyla maruz kalım gerçekleşir. Gaz ve buharlar solunum yoluyla kolay emilir. Su damlacıkları dahil, küçük partiküller (10 mikron ve daha küçük) de solunabilir. Pestisit, ürün uygulanmış yapraklardan ve topraktan buharlaşarak çalışanlar için yeniden maruz kalma tehlikesi oluşturabilir. Pestisite maruz kalımın bir diğer yolu ağız yoluyla alımdır (yutma) ve çoğunlukla pestisite dokunduktan sonra elleri yıkamadan yemek yeme veya sigara içme sonucu gerçekleşir (16).

Bitki Koruma Ürünlerinin Uygulanmasında Dikkat Edilmesi Gerekenler

Pestisitler mutlaka kilitli yerlerde, meskûn olmayan yerlerde, kapalı odalarda ve depolarda saklanmalıdır. Gıda maddeleri, hayvan yemleri, mutfak malzemeleri, yatak ve giyecekler ile aynı odada saklanmamalıdır. Kullanılmaması ihtimali olan ürün artıkları yahut etiketleri kaybolarak cinsi belirlenemeyen ürünler tarım yapılmayan boş bir araziye gömülerek imha edilmelidir. Bitki koruma ürünleri muhafaza amacıyla asla orijinal ambalajlarından diğer kaplara (kola şişesi, süt şişesi vb.) konmamalıdır. Boş ürün ambalajları asla başka amaçlar için kullanılmamalıdır. Boş ambalajlar çocukların ulaşamayacakları yerlere konmalı, ortada bırakılmamalı ve uygun bir şekilde imha edilmelidir. İlaç hazırlanan yerin havalandırması iyi olmalı,

uygulama sırasında mutlaka maske takılmalı, maske sıcak havada sık yüksek bitkilerin bulunduğu yerler ile açık arazilerde de kullanılmalıdır. İlaçlama esnasında özellikle süspansiyon, emülsiyon ve toz ürünlerle meşgul olurken koruyucu uygun bir elbise giyilmelidir. Koruyucu elbiseler sık sık değiştirilmeli ve temizlenmelidir. Zirai mücadele yapılırken yemek yenmemeli, su ve sigara içilmemeli, eller her uygulamadan sonra sabunlu su ile yıkanmalıdır. Ürünler asla deri ve göze temas etmemelidir, etmesi durumunda hemen bol sabunlu su ile yıkanmalıdır. Uygulama yapıldıktan sonra eğer ürün artarsa, artan ürün derelere, su kaynaklarına asla dökülmemelidir. Artan ürünler açılan çukurlara gömülerek imha edilmelidir. Yapılacak uygulamada hasat süresi dikkate alınmalı ve etki süresi az olan ürünler tercih edilmelidir. İnsan ve çevre sağlığı için en az düzeyde toksik, pestlere en etkili ve ruhsatlı maddeler kullanılmalı, ürün uygulama süresi kısa tutulmalı, özellikle çocuklar gibi duyarlı kişiler uygulama yapılan ortamdan uzaklaştırılmalı, uygulama yapan kişiler korunmak için kişisel önlemlerini almalı ve pestisitler çocukların ve riskli kişilerin kolay ulaşamayacağı yerlerde saklanmalıdır (20). Ayrıca çalışanlar pestisitlerin zarar ve riskleri, güvenli çalışma ilkeleri, acil durumlar ve gerekli sağlık kontrolleri konusunda bilgilendirilmelidirler (16).

TARIM ÇALIŞANLARININ BİTKİ KORUMA ÜRÜNLERİ KONUSUNDA BİLGİ VE DAVRANIŞLARI

Ülkemiz bir tarım ülkesidir. Toplam tarım alanları Türkiye İstatistik Kurumu'nun verilerine göre 38 milyon 411 bin hektar ve 2013 Ekim itibarıyla tarım alanında çalışan kişi sayısı 6 028 000 olarak bildirilmiştir (21). İstihdam edilenlerin %23,5'i tarımda çalışmaktadır. Tarımla ilgili yaşanan sorunlardan biri de tarımsal ürünlerde verim düşüklüğü, gübreleme, ıslah ve pazarlama sorunlarının yanı sıra ilaçlama ile ilgili organizasyon eksiklikleri olarak bildirilmektedir (22). Bu bölüme kadar aktarılan bilgilerden bitki koruma ürünlerinin doğru ve etkin bir şekilde

kullanılmasının; ürün verimini artırmakla birlikte insan sağlığı ve çevre üzerindeki olumsuz etkilerini azaltacağı anlaşılmaktadır. Bu nedenle tarım alanında çalışanların bitki koruma ürünleri konusundaki bilgi, tutum ve davranışlarını bilmek/anlamak önemlidir.

Dünyada bu konu ile ilgili özellikle Latin Amerika, Asya, Afrika ve Orta Doğuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ülkemizde tarım alanlarında üreticilerle yapılmış çalışmalara bakıldığında, çalışmanın adı ve amacı, üreticilerin bitki koruma ürünlerinin kullanımı, korunma önlemleri, bilgi tutum ve davranışları ile direkt olarak ilgili değildir. Ancak bu çalışmaların birçoğunda tarım alanında çalışan bireylerin bitki koruma ürünlerini kullanma, zamanlama, ürün seçimi ve doz belirlemede karar verirken nelere dikkat ettikleri, uygun dozda kullanıp kullanmadıkları, ürünlerde kalıntı kaygısı yaşayıp yaşamadıkları ve bu kaygı için neler yaptıkları, korunma ile ilgili olarak ürünleri hangi koşullarda sakladıkları, kullanım talimatlarını okuma ve uygulama durumları, uygulama sırasında kişisel koruyucu donanım (maske, eldiven, özel giysi) kullanıp kullanmadıkları, uygulama sırasında ya da sonrasında sağlık sorunu yaşayıp yaşamadıkları ve yaşıyorlarsa ne tür şikayetlerinin olduğu, kullanılmış boş ürün ambalajlarını nasıl bertaraf ettikleri, çevreyi koruma ile ilgili yaklaşımlarının sorgulanmış olduğu görülmektedir.

Bilgi Düzeyi ve Genel Yaklaşım

Dünyada yapılmış çalışmalarda bitki koruma ürünleri hakkında temel bilgi eksikliğinin olduğu, ürünlerin karıştırılarak kullanıldığı ve karışımlar konusunda da tarım çalışanlarının yeterli bilgi düzeyine sahip olmadıkları bildirilmiştir (23-25). Bitki koruma ürünleri hakkında yeterli bilgiye sahip olduğu belirlenenler çeşitli çalışmalarda %8 ile %58 arasında bildirilmiştir (26-29). Uyguladığı ürünün ismini bilenler %50, etiketler üzerindeki uyarı işaretlerini bilenler %25 ile %65 arasındadır (25, 28, 30-32). İnsan sağlığına etkilerini bilenler %17-98, çevreye ve diğer canlılara olan etkilerini bilenler %17-87 olarak bildirilmiştir (26, 28, 30-33). Zararlı

kontrolünde başka yöntem bilenler bir çalışmada %16 olarak belirlenmiştir (27). Eğitim düzeyi lise ve üstü olanlarda, 10 yıldan daha fazla süredir uygulama yapanlarda, bilgiyi ürünü satan kişiden almış olanlarda bitki koruma ürünlerinin doğru kullanımı konusunda bilgi düzeyinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (33). Bilgi düzeyi ile kullanım arasında anlamlı negatif ilişki olduğu, düşük bilgi düzeyinin aşırı miktarda kullanımla ilişkili olduğu belirlenmiştir (24).

Türkiye’de yapılmış çalışmalarda uygulayacağı ilacın ismini bilenler %87, insan sağlığına zararlarını bilenler %51, çevreye ve diğer canlılara etkisini bilenler %6 ve %33 olarak bildirilmiştir (34, 35). Erkeklerde, eğitim düzeyi lise üstü olanlarda bilgi düzeyi yüksektir. Bilgi düzeyi ile doğru/olumlu tutum ve davranış arasında pozitif yönde ilişki belirlenmiştir (36).

Kullanılan ürünün türü bölgeden bölgeye, yetiştirilen ürüne ve bölgedeki yoğun zararlı türüne göre değişiklik göstermektedir. Dünyadaki çalışmalarda insektisitlerin %33 ile %98 arasında, fungusitlerin %22 ile %72 arasında, herbisitlerin %5 ile %64 arasında, rodentisitlerin %2, akarisitlerin %1, nemasitlerin %84 sıklığında kullanıldığı tespit edilmiştir (23, 25, 27, 29, 32, 37-39). Türkiye’deki çalışmalarda bildirilen kullanım sıklıkları insektisitler için %29 ile %65 arasında, herbisitler %32, fungusitler %18 ile %29 arasında, akarisitler %12 ile %15 arasındadır (20, 34, 35).

Uygulama Zamanına ve İlaça Karar Verme

Dünyadaki çalışmalarda, tarım çalışanlarının %30-80’i kendi deneyimlerine göre uygulama zamanına ve ürüne karar vermektedirler (28, 30, 33, 40, 41). Yüzde 14-75’i diğer tarım çalışanlarının, %21-45’i ziraat mühendisi/uzmanının, %5-35’i Tarım Bakanlığı/Ofisi’nin, %12-28’i ürün bayisinin, %25’i medyanın, %2’si komşu/akrabanın önerilerine göre ürün uygulama zamanına ve ürüne karar vermektedirler (25-27, 30, 33, 37, 40). Ülkemizde yapılmış çalışmalarda tarım çalışanlarının %15-44’ü kendi deneyimlerine göre,

%6-20’si diğer tarım çalışanlarının, %6-59’u ziraat mühendisi/uzmanın, %6-48’i ürün bayisinin önerisine göre, %2-16 ürün etiketine göre, %78 hastalık/zararlı yoğunluğuna göre uygulama zamanına ve ürüne karar vermektedirler (36, 42-48).

İlaç Dozuna Uyuma

Dünyadaki çalışmalarda ürün etiketi üzerindeki doza uyuma düzeyi %50, önerilenden yüksek dozda ürün kullanma düzeyi %23-27 ve önerilenden düşük dozda ürün kullanma düzeyi %23 olarak bildirilmiştir (32, 33). Ülkemizdeki çalışmalarda ürün dozuna karar verirken etiket üzerindeki doza uyuma düzeyi %2-51, ürün bayisinin önerisine uyuma düzeyi %31, kendi deneyimlerine göre ürünün dozuna karar verme düzeyi %45, diğer çalışanların önerisine göre doz belirleme %5 olarak bildirilmiştir (36, 44, 45, 47, 49).

Ülkemizde yüksek dozda ürün kullanan tarım çalışanlarının dağılımı %18 ile %30 arasında bildirilmiştir (36, 47). Bitki koruma ürünlerinin tehlikeli olduğunu düşünen tarım çalışanlarının; daha çok uzmana danıştığı, bitki koruma ürünlerini tehlikeli bulan ve uzmana danışanların ise ürünleri önerilen dozda ve uygun miktarda kullandıkları bildirilmiştir (35).

Ülkemizde kimyasal savaşım uygulamalarına yönelik aşırı bir eğilimin olduğu ve üreticilerin çoğunun erken uyarı sisteminin öngördüğü uygulama sayısının çok üzerinde uygulama yaptıkları, üreticilerin kullandıkları ürünlerin biyoetkinliği konusundaki şüphelerinin yüksek olduğu ve bu şüphelerinin en büyük nedeni olarak da hastalık ve zararlıların pestisitlere karşı dayanıklılık kazanmış olmalarını gösterdikleri belirlenmiştir (48).

Ürün Etiketindeki Talimatları Okuma ve Uygulama

Pestisitler, etiketlerindeki talimatlara veya tehlikeli maddeler için geçerli güvenlik uygulamalarına göre uygulanmalı ve ulusal yasa ve uygulamaya uygun olarak imha edilmelidir (16).

Dünyadaki çalışmalarda tarım çalışanlarının ürün etiketindeki talimatları okuma düzeyi %22 ile %71 arasında, talimatları anlama düzeyi %33 ile %63 arasında ve talimatlara uyma düzeyi %68 olarak bildirilmiştir (28, 31, 32, 40). Yazının çok teknik ve yabancı dilde ve küçük punto ile yazılmış olması etiketteki talimatları okumama nedeni olarak belirlenmiştir (31).

Ülkemizdeki çalışmalarda tarım çalışanlarının ürün etiketindeki talimatları okuma düzeyi %50 ile %81 arasında, talimatlara uyma düzeyi ise %73 olarak bildirilmiştir (20, 34, 35, 43, 50).

Uygulama Sırasında Riskli Davranışlarda Bulunma

Dünyadaki çalışmalarda bitki koruma ürünlerinin uygulanması sırasında tarım çalışanlarının yeme-içme davranışında bulunma düzeyi %9-79, bir şeyler yeme düzeyi %1-22, bir şeyler içme düzeyi %2-10, sigara içme düzeyi %4-39 arasında bildirilmiştir (25, 26, 28, 33, 38, 41, 51).

Ülkemizdeki çalışmalarda bitki koruma ürünlerinin uygulanması sırasında tarım çalışanlarının yeme-içme davranışında bulunma düzeyi %58, bir şeyler yeme %36, bir şeyler içme %73, sigara içme %18 ile %32 arasında bildirilmiştir (20, 34- 36). Uygulama sırasında tarım çalışanlarının %21 ile %46'sı yanında başka kişilerin bulunduğunu belirtmiştir (20, 36).

Hijyen Kurallarına Uyma

Dünyadaki çalışmalarda ürün kullanımından sonra el yıkama sıklığı %60-100, tüm vücut temizliği %33-91, giysi değiştirme %20-95, giysi yıkama %42-69 arasında bildirilmiştir (25, 26, 28-31, 33, 38, 40, 41, 51). Bilgi düzeyi ile koruyucu önlem alma arasında pozitif yönde ilişki olduğu bildirilmiştir (33).

Ülkemizdeki çalışmalarda ürün kullanımından sonra el yıkama sıklığı %61, tüm vücut temizliği %88-95 arasındadır (20, 34-36).

Kalıntı Kaygısı

Latin Amerika'da yapılmış bir çalışmada, tarım çalışanların uygulama aralıkları konusunda doğru bilgiye sahip olmadıkları, sık aralıklarla uygulama yapıldığı, hasat bekleme zamanına uyulmadığı bildirilmiştir (25).

Ülkemizdeki çalışmalarda hasat için beklenmesi gereken süreyi tarım çalışanlarının %72'sinin bildiği ancak %9-32'sinin hasattan hemen önce uygulama yaptığı, %4-68'inin gerekli süreyi beklemeden hasat ettiği belirlenmiştir (36, 43, 48, 49).

İlaçların Uygun Koşullarda Saklanması

Pestisitler güvenli, korunaklı, iyi havalandırılmış ve yalnızca yetkili kişilerin girmesine izin verilen alanlarda depolanmalıdır. Bu alanlara gebe olan çalışanlar, çocuklar veya hayvanlar erişememelidir (16). Pestisitlerin çocukların ulaşamayacakları yükseklikte kapalı ve kilitli özel bir dolap içinde saklanması, mutfakta yenilecek ve içilecek gıda maddelerinin yanına konulmaması, orijinal ambalajından başka bir kaba aktarılmaması, etiketinin sökülmemesi ve ağzının kapalı tutulması önerilmektedir.

Dünyadaki çalışmalarda ürünleri depoda/kapalı ya da özel bir yerde saklayanlar %35-68, özel kilitli dolapta saklayanlar %8-10, evin herhangi bir yerinde saklayanlar %19-96 arasında belirlenmiştir (25, 27, 33, 37, 38, 40). Tarım çalışanlarının %23-55'i ürünleri uygun olmayan koşullarda saklamaktadır (31, 32).

Ülkemizdeki çalışmalarda ürünlerin %95 orijinal kabında ve %97 etiketiyle birlikte saklandığı belirlenmiştir (20). Ürünleri depoda, kapalı bir yerde veya malzeme odasında saklayanlar %32-53, özel kilitli dolapta saklayanlar %2-25, evin herhangi bir yerinde saklayanlar %16, serada saklayanlar %66'dır (20, 34, 50). Tarım çalışanlarının %45'i ürünleri uygun olmayan koşullarda saklamaktadır (20).

Kişisel Koruyucu Donanım Kullanımı

Kişisel koruyucu donanım mühendislik denetimlerinden, güvenli kaldırma ve taşıma uygulamalarından veya diğer uygun denetim önlemlerinden sonra gelmekle birlikte, uygulama esnasında koruyucu ekipmanların kullanılması akut pestisit zehirlenmelerine bağlı semptomların önlenmesi açısından önemli bir bariyer oluşturmaktadır (16, 52).

Dünyadaki çalışmalarda kişisel koruyucu donanımlardan en az birini kullandığı bildirilenler, en düşük orta Amerika'da en yüksek Afrika'da yapılmış bir çalışmada olmak üzere %31 ile %93 arasındadır (32, 39- 41, 51, 53). Uygulama sırasında özel koruyucu giysi kullanımı %1 ile %63 arasında, iş elbisesi kullanımı %55 düzeyindedir (33). Diğer koruyucu donanımlardan maske %1-88, eldiven %5-86, özel ayakkabı veya bot %16-94, şapka %40-67, gözlük %2-38 düzeyinde kullanılmaktadır (25, 26, 28-31, 33, 37, 38, 41, 53, 54). Bu çalışmalarda tarım çalışanlarının kişisel koruyucu donanım kullanmama nedenleri olarak ekipmanın olmaması, gerekli görmeme, konforlu veya rahat hissetmeme ve pahalı bulma temel nedenler olarak bildirilmiştir (38, 40). Erkeklerin, kendi işini yapanların, en az lise düzeyinde eğitim almış olanların ve gençlerin daha çok kişisel koruyucu donanım kullandığı belirlenmiştir (54).

Ülkemizdeki çalışmalarda kişisel koruyucu donanımlardan en az birinin kullanımı %24-41 düzeyindedir. Özel koruyucu giysi %10-12, ayrı bir giysi %36, eldiven %21-70 ve maske %9-48 düzeyinde kullanılmaktadır (20, 34-36, 48, 49, 55, 56).

Ürün Uygulama Sırasında ya da Sonrasında Görülen Sağlık Sorunları

Dünyadaki çalışmalarda tarım çalışanlarında bitki koruma ürünlerini kullanırken ya da sonrasında herhangi bir şikayetin görülme sıklığı %20 ile %70 arasında bildirilmiştir (23, 25, 27, 29, 32, 33, 37, 38, 53). Bildirilen sağlık sorunları; baş ağrısı (%31-81), deride kaşıntı (%8-70), baş dönmesi (%17-67),

gözlerde yanma/bulanık görme (%18-40), sıcaklık hissi (%39), halsizlik (%5-37), bulantı kusma (%30-35), öksürük (%30), unutkanlık/hafıza kaybı (%25), terleme (%25), salya artışı (%22), diyare (%21), göğüs ağrısı (%17), nefes darlığı (%8), dikkat azalması (%8), yorgunluktur (%5) (23, 25, 27, 29, 32, 33, 37, 38, 53). Koruyucu önlem alanlarda ve kişisel koruyucu donanım kullananlarda sağlıkla ilgili şikayetlerin daha az görüldüğü bildirilmiştir (33, 38).

Ülkemizdeki çalışmaların birinde tarım çalışanlarında bitki koruma ürünlerini kullanırken ya da sonrasında herhangi bir şikayet görülme sıklığı %72 olarak bildirilmiştir (36). Bildirilen sağlık sorunları; baş ağrısı (%28-44), baş dönmesi (%22-64), bulantı-kusma (%17-59), halsizlik (%38-50), huy değişikliği (%39), gözlerde yanma (%13-37), öksürük (%14-32), deride kaşıntı (%30), yorgunluk (%18), unutkanlık/hafıza kaybı (%22), uykusuzluk (%21), burun kanaması (%9), kilo kaybı (%6), tırnaklarda değişiklikler (%3) (20, 34, 36).

Çalışmalarda sağlık sorununun az görüldüğü gruplar belirlenmiş ve bu gruplar; gelir düzeyi yüksek olanlar, lise ve üstü eğitim almış olanlar, çiftçilik dışında başka bir mesleği olanlar, bitki koruma ürünlerinin etiketini ve kullanma talimatlarını okuyanlar, talimatlara uyanlar, uygulama sırasında her zaman eldiven ve maske kullandığını belirtenler ve ilacı açık ortamda hazırlayanlar olarak bildirilmiştir (20, 36). Ürün kullanımı sırasında riskli davranışlarda bulunan (uygulama esnasında sigara içen, bir şeyler yiyen ve içen) çalışanlarda uygulama sonrası sağlık sorunu yaşama düzeyi yüksek bulunmuştur (20). Ürün kullanımı sırasında/sonrasında sağlık sorunu görülmesinin gelir düzeyinin düşük olması, ürün hazırlama işleminin kapalı alanda yapılması, ürün kullanımı sırasında bir şeyler yeme ve bir şeyler içme ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (20, 36).

Bitki Koruma Ürünlerinin Boş Ambalajlarının Bertarafı

Pestisitler, etiketlerindeki talimatlara veya tehlikeli maddeler için geçerli ve ulusal yasa ve

uygulamaya uygun olarak bertaraf edilmelidir (16). Boş ambalajların direkt olarak herhangi bir çöplüğe atılması ya da tarlada bırakılması çevre kirliliği oluşturarak diğer canlılar açısından önemli sorunlara yol açabilir. Boş ürün ambalajlarının temizlenip değişik amaçlarla kullanılması da öncelikle insan sağlığı açısından önemli tehlikeler oluşturabilir. Kullanılmış pestisit kapları yıkanmalı, üç kez veya basınçla durulanmalı, tekrar kullanılmaması için delinmeli veya ezilmeli ve bir toplama planına göre veya onaylanmış bir atık yok etme yöntemiyle uygun bir biçimde yok edilmelidir. Bu kaplarda, başta yiyecek ve içecek olmak üzere, başka maddeler depolanmamalıdır (16).

Dünyadaki çalışmalarda boş ürün ambalajlarının çevreye bırakıldığı (%3-80), kanala veya dereye atıldığı (%33), çöpe atıldığı (%11-72), yakıldığı (%7-50), gömüldüğü (%3-18), biriktirilip satıldığı (%3-22), başka amaçlar için kullanıldığı (%2-11) veya özel atık kutularına atıldığı (%50) belirlenmiştir (25-27, 29-31, 33, 37, 38, 57).

Ülkemizdeki çalışmalarda boş ürün ambalajlarının çevreye bırakıldığı (%10-73), gömüldüğü (%6-54), çöpe atıldığı (%7-50), yakıldığı (%16-42) ve başka amaçlar için kullanıldığı (%5-23) tespit edilmiştir (20, 34-36, 43-45, 47-49, 58).

Tarım çalışanlarından bitki koruma ürünlerini çok tehlikeli bulanların ve eğitim seviyesi yüksek olanların boş ürün ambalajlarını uygun ve önerilen şekilde bertaraf ettikleri belirlenmiştir (35).

Bitki Koruma Ürünlerinin Çevreye Etkilerinin Farkında Olma ve Korumaya Özen Gösterme Davranışları

Brezilya'da yapılmış bir çalışmada tarım çalışanlarının kullandıkları ürünlerin çevreye etkilerinin farkındalığı %17 olarak bildirilirken, bu farkındalık düzeyi Güney Hindistan'da %40, Filistin'de %57, Kenya'da %81 ve Nepal'de %87 olarak bildirilmiştir (26, 28, 31-33). Sağlık etkilerini bilme düzeyi Brezilya'da yapılmış bir çalışmada %17,

Güney Hindistan'da %70, Kenya'da %81, Filistin'de %86, Nepal'de %98 olarak bildirilmiştir (26, 28, 31-33). Rüzgara ve yağmura dikkat ederek uygulama yapanların düzeyi Nepal'de yapılmış bir çalışmada %50, Filistin'de %59, Etiyopya'da %63, Filipinler'de %66 ve Brezilya'da %100 olarak bildirilmiştir (28, 31, 33, 41, 51).

Ülkemizdeki bir çalışmada tarım çalışanlarının %67'sinin ürünlerin çevreye etkilerinin farkında olduğu ancak %18'inin ürünlerin çevreye bir etkisi olmadığı görüşünde oldukları belirlenmiştir (48). Bal arıları, balıklar gibi canlıları dikkate alarak uygulama yapanlar %23-42, evcil hayvanlarla birlikte yabani hayvanları da dikkate alanlar %10-15, rüzgara dikkat ederek uygulama yapanlar %75 düzeyindedir (35, 36, 48).

Uygulama Sonrası Artan Ürün ile İlgili Davranışlar

Ülkemizde uygulama sonrası artan ürün ile ilgili davranışların sorgulandığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yunanistan'da yapılmış bir çalışmada tarım çalışanlarının %83'ünün ihtiyacından fazla ürün hazırladığı bildirilmiştir (57). Tekrar kullanmak için ürünü saklama düzeyi Yunanistan'daki çalışmada %2, Filistin'de %39 ve Brezilya'da %67 olarak tespit edilmiştir (29, 33, 57). Yunanistan'daki çalışmada tarım çalışanlarının %55'inin hazırlanan ürünü bitinceye kadar uyguladığı, %36'sının başka ürünler üzerine artan ürünü uyguladığı, %24'ünün yaktığı, %16'sının çöpe attığı, %5'inin orijinal kabıyla gömdüğü, %4'ünün dereye ve %1'inin ise toprağa döktüğü belirlenmiştir (57).

SONUÇ

Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmaların sonuçları, ülkemizde tarım çalışanlarının bitki koruma ürünleri konusunda bilgi ve davranışları ile ilgili tespit edilen olumsuzlukların dünyadaki çalışmalarla benzer olduğunu göstermektedir. Ülkemizde üreticilerin büyük çoğunluğu ürün uygulama zamanına kendisi karar vermekte, kullanacağı ilacı ve dozunu kendisi

belirlemektedir. İlacın önerilen dozuna uymayanlar ve yüksek dozda ürün uygulayanlar da azımsanmayacak düzeydedir. Üreticilerin büyük çoğunluğu tarım ürünlerinde bitki koruma ürününün kalıntı sorununu önemsememekte ve uygulama yaparken de bu durumu dikkate almamaktadırlar. İlacın uygulama sonrası bekleme sürelerine de çoğunlukla uyulmamaktadır. Tarım çalışanları ürünleri hazırlarken yanlarında başka kişileri hatta çocuklarını bulundurmakta, ürün kullanımından sonra kişisel temizliklerini yeterince yapmamaktadırlar. Bitki koruma ürünlerinin uygun saklanması ile ilgili kurallara uymayanların bulunduğu görülmektedir. Üreticiler bitki koruma ürünlerini kullanırken kişisel koruyucu donanımları yeterince kullanmamaktadırlar. Ürün kullanımı sırasında veya sonrasında ürünü kullanan bireylerde akut etkilenim belirtileri yaygın olarak görülmektedir. Özellikle ürün kullanımı sırasında riskli davranışlarda bulunanlarda şikayetlerin görülme olasılığı yüksektir. Üreticiler boş ürün ambalajlarını uygun şekilde bertaraf etmemekte, çevreye rasgele bırakmakta, bir kısmı ise bu ambalajları yeniden kullanmaktadır. İlaçlama sırasında büyük bir kısmının çevreyi ve çevredeki evcil hayvanları dikkate almaması da endişe vericidir.

Öneriler

Tarım alanında çalışan bireyler bitki koruma ürünlerinin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili eğitilmelidirler. Bu eğitimler ürünlerin çevreye ve insana verdiği zararlar, ürünlerin hangi koşullarda, ne şekilde muhafaza edilmesi gerektiği, risk altındaki gruplar, uygulamada dikkat edilmesi gerekenler, uygulama sırasında alınması

gereken kişisel koruyucu tedbirler, uygulama sonrası bitki koruma ürünlerinin kalıntılarının vücuttan uzaklaştırılması, boş ürün ambalajlarının nasıl imha edilmesi gerektiği, zehirlenmelerde ilk müdahale önlemleri konularını içermelidir. Tarım alanında çalışanların yanı sıra bitki koruma ürünlerinin temin edildiği ürün bayilerinin, kooperatiflerin ve tarım müdürlüklerinde çalışan personelin de bu konularda eğitimi yerinde olacaktır.

Son yıllarda mevzuatta yapılan değişikliklerle birlikte bitki koruma ürünlerinin kullanımı için eğitim ve sertifika şartı getirilmiş olsa da pratikte sertifikası olmayan bireylerinde uygulama yaptıkları bilinmektedir. Ayrıca eğitimlerin davranış değişikliğine dönüşmesi de önemlidir. Tarım çalışanlarında güvenli davranış geliştirmeyi sağlayacak programlar geliştirilmeli ve tarım çalışanları bu açıdan (daha sık) denetlenmelidir.

Bitki koruma ürünlerinin güvenli kullanımı konusunda yapılan yasal düzenlemelerin tarım çalışanlarının davranışlarına etkisini inceleyen yeni çalışmalar yapılmalıdır. İlaçlama işleminin profesyonel elemanlarca yapılması en azından uzman kontrolünde uygulamaların özendirilmesi bitki koruma ürünlerinin yanlış ve fazla kullanımını önleyerek insana ve çevreye olan zararlı etkilerini azaltabileceği gibi aynı zamanda akut pestisit zehirlenmelerinin de önlenmesini sağlayabilir. Bitki koruma ürünlerine ait boş ambalajlar çevre ve insan sağlığı açısından ciddi tehlikeler oluşturmaktadır. Bu ambalajların tarım çalışanlarından toplanarak uygun şekilde imha edilmesi için gerekli düzenlemeler yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Miller GT. Living in the Environment. 12th ed. Belmont: Wadsworth/Thomson Learning, 2002.
2. Çağlarımak N. Gıda güvenliğinin çevre kirliliği yönünden irdelenmesi. 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, 24-27 Ekim, İzmir, 2007.
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002.
4. Tekbaş ÖF. Biyosidal Ürünlerin Çevre ve Halk Sağlığı Üzerine Etkileri, <http://www.turkiyesel.com/uvkb.org/ilaclar-ve-etken-maddeler/358-biyosidal-urunlerin-cevre-ve-halk-sagligi-uzerine-etkileri.html> [Erişim tarihi: 11/01/2014].
5. Resmi Gazete. Bitki Koruma Ürünlerinin Uygulama Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik. 20.03.2011 Tarih ve 27880 Sayı.
6. Crop Protection Association (CPA). Crop Protection Association Handbook. Peterborough: Crop Protection Association, 2000.
7. Kızılaslan N, Yaşa Ö. Türkiye'deki tarımsal mücadele üretim tüketim ve dış ticaretinin Avrupa Birliği uyum sürecinde gelişim seyri. GOÜ Ziraat Fak Derg, 2011; 28(2): 103-16.
8. T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı (TKB). Türk Tarım Sektörünün Avrupa Birliği Üyeliği Sürecinde Değerlendirilmesi, Bitki Sağlığı, Gıda Güvenilirliği ve Veterinerlik Faslı. Ankara: T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Dış İlişkiler ve Avrupa Birliği Koordinasyon Dairesi Başkanlığı, 2009.
9. Kantarcı M. Global BKÜ Pazarı ve AR-GE. Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi, 25-26 Ekim, Ankara, 2007.
10. Durmuşoğlu E, Tiryaki O, Canhilal R. Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve dayanıklılık sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi, 11-15 Ocak, Ankara, 2010.
11. Öncüer C. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Bornova-İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, 1995,
12. Yazgan MS. Türkiye'de pestisit kirliliği. Türkiye'de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II, 22-23 Mayıs, Gebze, İstanbul, 1997.
13. World Health Organization (WHO)/ United Nations Environment Programme (UNEP). Toxic Hazard. <http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicals/en/index.html> [Erişim tarihi: 14/01/2014].
14. United Nations Environment Programme (UNEP). The state of the environment: freshwater. GEO-2000: global environment outlook. Nairobi: United Nations Environment Programme, 1999.
15. World Health Organization (WHO). The world health report 2003 - shaping the future. Geneva: World Health Organization, 2003.
16. Piyal B. (çev ed.) Tarımda Güvenlik ve Sağlık (Uluslararası Çalışma Örgütü Düzenlemeleri). Ankara: T.C. Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı, Çalışma ve Sosyal Güvenlik Eğitim ve Araştırma Merkezi (ÇASGEM), Ankara, 2013.
17. World Bank. Toxics and poverty: the impact of toxic substances on the poor in developing countries. Washington DC: World Bank, 2002.
18. United Nations Environment Programme (UNEP). Childhood pesticide poisoning: information for advocacy and action. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/United Nations Environment Programme (UNEP)/World Health Organization (WHO), 2004.
19. World Health Organization (WHO). Public health impact of pesticides used in agriculture. Geneva: World Health Organization, 1990.
20. Yalap Tuna R. Çiftçilerin pestisitleri saklama koşulları ve güvenli kullanımı konusunda bilgi tutum ve davranışları. Halk Sağlığı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2011.
21. Türkiye İstatistik Kurumu. Hane halkı işgücü sonuçları. Temel istatistikler, TÜİK, 2014. <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist> [Ulaşım tarihi: 17/01/2014].
22. Özey R. Türkiye tarım ülkesi midir? Ekodialog <http://www.ekodialog.com/Makaleler/turkiye-tarim-ulkesi-mi-makale.html> [Erişim tarihi: 17/01/2014].
23. Ngowi AVF, Mbise TJ, Ijani ASM, London L, Ajayi OC. Pesticides use by smallholder farmers in vegetable production in Northern Tanzania. Crop Prot 2007; 26 (11): 1617-24.

24. Chen R, Huang J, Qiao F. Farmers' knowledge on pest management and pesticide use in Bt cotton production in China. *China Econ Rev*, 2013; 27: 15-24.
25. Jors E, Morant RC, Aguilar GC, Huici O, Lander F, Baelum J, et al. Occupational pesticide intoxications among farmers in Bolivia: a cross-sectional study. *Environ Health*, 2006; 5: 10.
26. Mohanty MK, Behera BK, Jena SK, Srikanth S, Mogane C. Knowledge attitude and practice of pesticide use among agricultural workers in Puducherry, South India. *J Forensic Leg Med*, 2013; 20 (8): 1028-31.
27. Abang AF, Kouame CM, Abang M, Hannah R, Fotso AK. Vegetable growers perception of pesticide use practices, cost and health effects in the tropical region of Cameroon. *Intl J Agron Plant Prod*, 2013; 4 (5): 873-3.
28. Atreya K. Pesticide use knowledge and practices: a gender differences in Nepal. *Environ Res*, 2007; 104 (2): 305-11.
29. Ribeiro MG, Colasso CG, Monteiro PP, Pedreira Filho WR, Yonamine M. Occupational safety and health practices among flower greenhouses workers from Alto Tietê region (Brazil). *Sci Total Environ*, 2012; 416: 121-6.
30. Salameh PR, Balhi I, Brochard P, Abi Saleh B. Pesticides in Lebanon: a knowledge, attitude and practice study. *Environ Res*, 2004; 94 (1): 1-6.
31. Waichman AV, Eve E, da Silva Nina NC. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Prot*, 2007; 26 (4): 576-83.
32. Macharia I, Mithöfer D, Waibel H. Pesticide handling practices by vegetable farmer in Kenya. *Environ Dev Sustain*, 2012; 15 (4): 887-902.
33. Zyoud SH, Sawalha AF, Sweileh WM, Awang R, Al-Khalil S, Al-Jabi SW, et al. Knowledge and practices of pesticide use among farm workers in the West Bank, Palestine: safety implications. *Environ Health Prev Med*, 2010; 15 (4): 252-61.
34. Ergonen AT, Salacin S, Ozdemir MH. Pesticide use among greenhouse workers in Turkey. *J Clin Forensic Med*, 2005; 12 (4): 205-8.
35. Isın S, Yildirim I. Fruit-growers' perceptions on the harmful effects of pesticides and their reflection on practices: the case of Kemalpaşa, Turkey. *Crop Prot*, 2007; 26 (7): 917-22.
36. Şahin G, Uskun E, Ay R, Öğüt S. Elma Yetiştiriciliği Alanında Çalışanların Tarım İlaçları Konusunda Bilgi, Tutum ve Davranışları. *TAF Prev Med Bull*, 2010; 9 (6): 633-44.
37. Ntow W, Gijzen HJ, Kelderman P, Drechsel P. Farmer perceptions and pesticide use practices in vegetable production in Ghana. *Pest Manag Sci*, 2006; 62 (4): 356-65.
38. Esehie JO, Ibitayo OO. Pesticide use and related health problems among greenhouse workers in Batinah Coastal Region of Oman. *J Forensic Leg Med*, 2011; 18 (5): 198-203.
39. Polidoro BA, Dahlquist RM, Castillo LE, Morra MJ, Somarriba E, Bosque-Perez NA. Pesticide application practices, pest knowledge and cost-benefits of plantain production in the Bribri-Cabe'car Indigenous Territories, Costa Rica. *Environ Res*, 2008; 108 (1): 98-106.
40. Mathews G, Wiles T, Baleguel P. A survey of pesticide application in Cameroon. *Crop Prot*, 2003; 22 (5): 707-14.
41. Palis FG, Flor RJ, Warburton H, Hossain M. Our farmers at risk: behaviour and belief system in pesticide safety. *J Public Health (Oxf)*, 2006; 28 (1): 43-8.
42. Tanrıvermiş H. Orta Sakarya Havzası'nda domates üretiminde tarımsal ilaç kullanımının ekonomik analizi. Ankara: T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları, No: 42, 2000.
43. Kadioğlu İ. Tokat İlinde üreticilerin zirai mücadele etkinlikleri üzerine bir araştırma. *GOÜ Ziraat Fak Derg*, 2003; 20 (1): 7-15.
44. Zeren O, Kumbur H. İçel İlinde tarımsal ilaç pazarlama, kullanım tekniği ve etkinliği üzerine araştırmalar. *Türk- Koop Ekin*, 1998; 2 (5): 62-8.
45. Üremiş İ, Karaat Ş, Gönen O, Canıhoş E, Kütük H, Ekmekçi U, ve ark. 1996. Çukurova Bölgesi'nde zirai ilaç kullanımının genel değerlendirmesi. II. Ulusal Zirai Mücadele İlaçları Sempozyumu, 18-20 Kasım, Ankara, 1996.

46. Yücel A, Çıkman E, Yücel M. Güneydoğu Anadolu Bölgesi (GAP) uygulamaya konulmadan önce Harran Ovasında çiftçinin tarımsal mücadeleye bakışı. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, 27- 29 Nisan 1995, Şanlıurfa.
47. İnan H, Boyraz N. Konya İlindeki zirai ilaç bayilerinin bazı yönlerden değerlendirilmesi. SÜ Ziraat Fak Derg, 2003; 17 (32): 86-96.
48. Boyraz N, Kaymak S, Yiğit F. Eğirdir İlçesi elma üreticilerinin kimyasal savaşım uygulamalarının genel değerlendirilmesi. SÜ Ziraat Fak Derg, 2005; 19 (36): 37-51.
49. Demircan V, Aktaş AR. Isparta İli kiraz üretiminde tarımsal ilaç kullanım düzeyi ve üretici eğilimlerinin belirlenmesi. Tarım Ekon Derg, 2004; 9: 51-65.
50. Karabat S. Manisa İli bağ alanlarında kullanılan tarımsal ilaçların gıda güvenliğine etkisinin koşullu değerlendirme yöntemiyle analizi ve üretici duyarlılığının belirlenmesi üzerine bir araştırma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
51. Mekonnen Y, Agonafir T. Pesticide sprayers' knowledge, attitude and practice of pesticide use on agricultural farms of Ethiopia. Occup Med (Lond), 2002; 52 (6): 311-5.
52. Branson DH, Sweeney M. Pesticide personal protective clothing. Rev Environ Contam Toxicol, 1991; 122: 81-109.
53. Feola G, Binder CR. Why don't pesticide applicators protect themselves? Exploring the use of personal protective equipment among Colombian smallholders. Int J Occup Environ Health, 2010; 16 (1): 11-23.
54. Hwang SA, Gomez MI, Stark AD, St John TL, Pantea CI, Hallman EM, et al. Safety awareness among New York Farmers. Am J Ind Med, 2000; 38 (1): 71-81.
55. Çömelekoglu Ü, Arpacı A, Mazmancı B. Pestisidlerle kronik olarak karşılaşan tarım işçilerinin pestisitlerden korunma konusundaki tutumları. 3. İşçi Sağlığı Kongresi, 20- 23 Nisan, Ankara. 1998.
56. Budak F, Bostan Budak D. Farm level analysis of pesticide use in cotton production in East Mediterranean region of Turkey. J Environ Biol, 2006; 27 (2): 299-303.
57. Damalas CA, Telidis GK, Thanos SD. Assessing farmers' practices on disposal of pesticide waste after use. Sci Total Environ, 2008; 390 (2-3): 341-5.
58. Demircan V, Yılmaz H. Isparta İli elma üretiminde tarımsal ilaç kullanımının çevresel duyarlılık ve ekonomik açıdan analizi. Ekoloji, 2005; 14 (57): 15-25.

Bitkilerde RNA interferans

RNA interference in plants

Sümer ARAS¹, Semra SOYDAM-AYDIN², Aslı FAZLIOĞLU¹,
Demet CANSARAN-DUMAN³, İlker BÜYÜK¹, Kürşat DERİCİ⁴

ÖZET

RNA interferans (RNAi) mekanizması, hücreye giren çift zincirli RNA'nın (dsRNA) komplementeri olan mRNA zincirinin degradasyonuna yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma (post-transcriptional gene silencing), ya da gen ifadesinin düzenlenmesi olarak tanımlanır. RNAi mekanizması sırasında, hedef mRNA'ya komplementer dizi, 500 kDa ağırlığında ve nükleaz aktiviteli bir RNA-multi protein kompleksi olan RISC faktörü aracılığı ile mRNA'nın anlamlı dizisine bağlanır ve gen susturulma mekanizması bu RISC faktörü aracılığı ile kontrol edilir. Gen susturulması mRNA'nın RISC faktöründe bulunan 'Argounate' proteinle etkileşime girmesi ve 'Dicer' enzimi tarafından tanınıp kesilmesi ile gerçekleşir. Bu mekanizma, genomun virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerin istilasından korunmasını sağlamak amacıyla gerçekleşen doğal bir işlemdir. RNAi mekanizması, ökaryot organizmalarda iki tür molekül tarafından gerçekleştirilir. Bu moleküller 22 nükleotid uzunluğunda miRNA (micro RNA) ve 21-23 nükleotid uzunluğunda, çift zincirli siRNA (small interfering RNA) molekülleridir. Son yıllarda bilim dünyasının önde gelen konuları arasında yer alan RNAi araştırmaları ile çeşitli organizmalarda genlerin işlevlerini inceleme, işlevlerini bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını belirleme, konak patojen ilişkisi, üreme, programlanmış hücre ölümü, tümör oluşumu

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is defined as silencing of gene after transcription (post-transcriptional gene silencing), when double stranded RNA (dsRNA) steps into the cell and cause degradation of endogenic complementary mRNA, or regulation of gene expression process. During RNAi mechanism, complementary sequence of target mRNA connects to sense strand of mRNA by factor of RISC. Gene silencing mechanism is controlled by RISC factor with a mass of 500 kDa which is RNA multi protein complex with nuclease activity. Silencing is occurred by cutting of mRNA, which is interacting with Argounate protein on RISC factor, with Dicer enzyme. This silencing mechanism is natural and takes a position in defending genome and biological function of organisms from invasion of movable genetic material such as viral hereditary material and transposons. RNAi mechanism realized with two kinds of molecules in eukaryotic organisms. These are miRNA (microRNA) which is 22 bp and siRNA (small interfering RNA) which is 21-23 bp. In recent years RNAi has become prominent research area in science world. Several information were achieved with researches of RNAi such as determining function of genes, host-pathogen interaction, reproduction, apoptosis (programmed cell death) and tumorigenesis etc.

¹ Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA

² Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, ANKARA

³ Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, ANKARA

⁴ Hitit Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, ÇORUM

İletişim / Corresponding Author : Semra SOYDAM-AYDIN

Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, ANKARA

Tel : +90 312 565 55 17

E-posta / E-mail : semrasoydam@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 12.11.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 09.02.2015



gibi birçok alanda bilgi sahibi olunmuştur. Ayrıca; bitkilerde kodlanmayan RNA'ların doku farklılaşması ve gelişiminin kontrolü, sinyal iletimi, fitohormonlarla etkileşim, abiyotik (kuraklık, tuzluluk vb.) ve biyotik (patojenler vb.) stres gibi çevresel etmenlere verilen cevaplarda rol oynadığı görülmüştür. Bu derleme çalışmasında RNAi mekanizmasının temelleri ve bitkilerde RNAi kullanımı açıklanmaya çalışılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Bitki, RNAi, miRNA, siRNA

Also, determined with RNAi researchs that; non-coding RNA plays role in controlling of tissue development and differentiation, signal transduction, interaction with phytohormone, responses of abiotic (drought, salinity etc.) or biotic (pathogens etc.) stress. As a conclusion, this review will try to explain base of RNAi mechanism and usage in plants.

Key Words: Plant, RNAi, miRNA, siRNA

GİRİŞ

Çift zincirli RNA (çzRNA; Double stranded RNA: dsRNA) ile transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesinde kullanılan mekanizmaya RNA interferans (RNAi) denir. RNAi hücreye giren dsRNA'nın homoloğu olan mRNA zincirinin degradasyonu aracılığı ile transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması (post-transcriptional gene silencing) olarak da tanımlanır.

RNAi, Napoli ve arkadaşlarının *Petunia* bitkisinde "chalcone synthase (CHS)" geninin over-ekspresyonunu sağlamaya çalıştıkları araştırmaları sırasında ortaya çıkan önemli bir buluştur. Araştırmacılar daha mor renkli petunyalarda elde etmek isterken ebruli petunyalarda elde etmişlerdir. (1). Bunun sebebinin CHS içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonu ile ilgili olduğu ve bunun transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizması olabileceği rapor edilmiştir (2). Çift zincirli RNA'nın gen ekspresyonunu engellediği, Fire ve Mello (1998) tarafından *Ceanorhabditis elegans* ile yaptıkları çalışma ile gösterilmiştir ve bu çalışmaları ile 2006 yılında Fizyoloji ve Tıp alanında Nobel ödülünün sahibi olmuşlardır (3). Bütün bu gelişmeler sonrasında bilim dünyasının ilgisi RNAi üzerine yoğunlaşmış, genlerin işlevlerini inceleme ve işlevlerini

bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını belirlemek önem kazanmıştır. Bu derleme çalışmasında RNAi mekanizmasının temelleri, bitkilerde gen fonksiyon analizleri için RNAi kullanımı açıklanmaya çalışılacaktır.

RNAi Mekanizması ve Görev Alan RNA Tipleri

RNAi mekanizması sırasında, hedef mRNA'ya komplementer dizi RNA, nükleaz aktiviteli bir RNA-multi protein kompleksi olan RISC faktör (Induced Silencing Complex) üstünde, mRNA'nın anlamlı dizisine bağlanır. Gen susturulması bu RISC faktörü aracılığı ile kontrol edilir. RISC faktöründe bulunan 'Argonate' isimli proteinle etkileşim içerisine giren mRNA, RNaz III ailesi içerisinde yer alan ve bir ribonükleaz olan 'Dicer' enzimi tarafından tanıyıp kesilir ve böylece susturma gerçekleşir (4). RNAi mekanizması, diğer bir deyişle gen susturma mekanizması ökaryot organizmalarda iki tür molekül tarafından gerçekleştirilir. Bu moleküller 22 nükleotid uzunluğunda miRNA (micro RNA) ve 21-23 nükleotid uzunluğunda olan çift zincirli siRNA (small interfering RNA),'dır. (5-9).

miRNA ve siRNA'lar birbirlerine çok benzerler ancak, aralarındaki farklar aşağıdaki gibidir:

- miRNA 1993 yılında, siRNA 1999 yılında keşfedilmiştir.
- miRNA endojen genlerin düzenlenmesinden sorumlu iken, siRNA genom bütünlüğünün korunmasından sorumludur.
- miRNA öncülü saç tokası yapısında tek zincirli RNA (single strand: ssRNAs), siRNA öncülü ise uzun dsRNAs'dır.
- miRNA mRNA yıkımı, translasyonun baskılanmasından sorumludur, siRNA ise DNA metilasyonu, histonların modifikasyonu ve mRNA yıkımından sorumludur.
- miRNA için gerekli Argounate proteinler AGO1, AGO10, siRNA için gerekli Argounate proteinler ise AGO1, AGO4, AGO6, AGO7'dir.
- Bitkilerde miRNA hedef sekansa parsiyel ya da tam komplementerlik sağlarken, siRNA tam komplementerlik sağlar.
- miRNA hücre gelişimi ve farklılaşması, gelişim süreçleri, biyotik ve abiyotik streslere cevapta görev alırken, siRNA transpozonlara ve virüslere karşı korumada ve stres adaptasyonunda görev alır (9-18).

miRNA yolağı nükleusta pri-miRNA'ların, "Drosha enzimi" aracılığı ile yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda ve saç tokası yapısında olan pre-miRNA'lara dönüşümü ile başlar. pre-miRNA'lar sitoplazmaya aktarılır ve diğer bir RNase olan Dicer aracılığı ile miRNA dublekslerine çevrilir. Dicer enziminin işlev görmesinin ardından kısa dsRNA dublekslerin biri baz eşleşmesi aracılığı ile hedef mRNA'ya bağlanmak üzere RISC faktörü ile etkileşime girer. Oluşan bu miRNA'lar translasyonun baskılanması veya mRNA'ların degradasyonuna aracılık etme kapasitelerine sahiptirler. Bu özellikleri ile de modern moleküler biyolojinin ilgi çeken konuları arasında yerlerini almışlardır (19, 20). Bitkilerde translasyonun baskılanması veya direk olarak mRNA'ların parçalanması kapasitelerinden hangisinin gerçekleşeceği miRNA'ların hedef mRNA

üzerinde bağlandıkları bölgeye göre değişiklik gösterir. mRNA'nın translasyona uğramayan bölgesine (untranslated region-UTR) bağlanırsa eksik komplementerlik olur ve translasyon baskılanır. Translasyona uğrayan (open reading frame-ORF) bölgesine bağlanması ise tam komplementerlik gösterir ve Argounate2 (AGO2) tarafından mRNA'nın yıkımı gerçekleşir (21-23). siRNA'lar öncülü dsRNA'lardır ve dsRNA'lar Dicer enzimi tarafından 3' ucunda çıkıntı kalacak şekilde kesiler 20-25 bp'lık siRNA'ları meydana getirirler. Çift iplik yapısında olan siRNA'lar RISC faktörleri ile birleşerek tek iplikli yapıya dönüşürler ve mRNA degradasyonu ile gen susturma işlevi görürler (19, 20, 24).

RNA İnterferans Teknolojisinin Bitkilerde Kullanımı

Bitkilerde RNA interferans çalışmalarının temelini; Napoli ve arkadaşlarının Petunya bitkisinde *Agrobacterium tumefaciens* vektörü aracılığı ile CHS geninin over-ekspresyonunu sağlanmaya çalıştıkları araştırma oluşturmuştur. Araştırmada pigmentasyon artırılıp daha koyu renkli petunyalarda elde edilmeye çalışılmış ancak renksiz, açık renkli veya alacalı bitkiler elde edilmiştir. Aynı ekibin ileri araştırmaları ile pigment üretiminden sorumlu gen ve homolog genlerin ekspresyonlarının virüsün 35S promotörü tarafından baskılandığı gösterilmiştir. CHS içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonu ile gen susturmanın gerçekleştiği belirlenmiştir (1, 25).

miRNAi mekanizması ilk kez 2002 yılında Park ve arkadaşlarının Arabidopsis'te yaptıkları araştırma ile keşfedilmiştir. Araştırmada benzer görevleri olan CAF (carpel factory) geni ve HN1 genlerinin miRNA metabolizmalarının da benzer olacağı düşünülmüştür. Bu genlerin fonksiyonlarını belirleyebilmek amacıyla HEN1-1 and CAF-1 mutant Arabidopsis bitkilerinden ve herhangi bir mutasyon içermeyen Arabidopsis bitkisinden miRNA izolasyonu yapılmıştır. Ayrıca potansiyel homolog genleri taşıdığı düşünülen tütün, pirinç ve mısır

bitkilerinden de izolasyon yapılmıştır. Araştırma sonucunda miRNA oluşumunun gelişim tarafından kontrol edildiği ve HEN1-1 and CAF-1 mutant bitkilerde yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir (26). miRNA'ların biyogenezine ilişkin pek çok ayrıntı yine bu model bitki aracılığı ile belirlenmiştir. miRNA günümüze değin Arabidopsis, Oryza, Nicotiana, Z. mays, Sorghum, Populus, Gossypium, Brassica, Vitis, Physcomitrella, Chrysanthemum gibi çok çeşitli bitkilerde belirlenmiştir (27-39). Bitkiler yaşamları sürecinde biyotik faktörler; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların saldırıları sonucu oluşan stres faktörleri ve abiyotik faktörler (su, sıcaklık, radyasyon, kimyasallar, manyetik ve elektriksel alanlar) gibi çok çeşitli stres faktörleri ile karşılaşabilirler (40, 41). Bitkiler stresle ilişkili çok çeşitli proteinler, transkripsiyon faktörleri, metabolitler yolu ile ya da epigenetik regülasyonlar yolu ile cevap verebilirler. Epigenetik değişiklikler; özellikle bitki bir abiyotik strese maruz kaldığında gen ekspresyonu değişikliklerinde önemli rol oynayan RNA tarafından yönlendirilmiş DNA metilasyonu, histon ve ya DNA modifikasyonlarını kapsar (42-44).

Bitkilerde kodlanmayan RNA'ların protein kodlayan bir genin duplikasyonundan insersiyona uğraması ya da bitki genomunun %80'inden fazlasını oluşturan transpozonlardan köken alabileceği gibi farklı mekanizmalarla oluşabileceği öngörülmüş ancak bitkilerde biriken mutasyonlar nedeniyle kesin bir köken belirlemenin oldukça zor olduğu belirtilmiştir (45-47). Kökeni konusunda kesin bir kaniya varılamasa da bitkilerde RNAi genom bilimi, genlerin fonksiyonlarını belirleme, doku farklılaşması ve gelişiminin kontrolü, sinyal iletimi, fitohormonlarla etkileşim, çevresel etmenlere verilen cevabın belirlenebilmesi gibi pek çok alanda kullanım potansiyeli olan bir teknolojidir. RNA interferans teknolojisinin bitkilerde uygulamasına yönelik çok çeşitli örnekler vermek mümkündür.

Lindbo ve ark. 1993 yılında gerçekleştirdikleri araştırmada; tütün bitkilerini tütün mozaik virüsü (TEV) kılıf proteini (CP) geni ile manipule etmişlerdir. Başlangıçta transforme olan bitkilerde enfeksiyonun bütün özellikleri görülürken, ileriki haftalarda bitkilerin iyileştiği kaydedilmiştir. İyileşmiş dokularda yapılan moleküler analizler sonucunda TEV dizilerinin transkripsiyonun hala devam ettiği ancak mRNA'larının işlevlerinin olmadığı anlaşılmıştır. Bu çalışmanın sonunda araştırmacılar, gen susturulmasının ya da eş-baskılamanın sitoplazmada lokalize olduğu ve post-transkripsiyon safhasında gerçekleştiği fikrine ulaşmışlardır (48).

Angell ve Baulcombe (1997) araştırmalarında; bitki genomuna aktarılan transgeni taşıyacak olan vektörleri (PVX -Patato Virus X) viral replikasyon esnasında seçilmiş genin de ifade edilmesini sağlamak amacıyla cDNA (komplmenter DNA) içerecek şekilde tasarlamışlardır. Çalışma sonucunda beklenilenin tersine, aktarılan genin ifadesini gözlemlemek yerine, vektör aracılı transgen sisteminin, yüksek seviyede post transkripsiyonel susturmayı indüklediği belirlenmiştir (49).

Defang ve ark (2014) RNAi teknolojisinin mısır (*Zea mays*) bitkisinde şeker kamışı mozaik virüsüne (SCMV) karşı direnç oluşturmada kullanımını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kılıf protein (cp) geninin transkripsiyonu ile oluşan saç tokası yapısındaki RNA'ların SCMV enfeksiyonunu engellediği görülmüş ve RNA interferans-post transkripsiyonel gen susturma yaklaşımının bitkilerde virüs enfeksiyonlarının kontrol edilmesinde önemli bir yaklaşım olabileceği belirtilmiştir (50). Yapılan diğer çalışmalar ile de gen ekspresyonunun engellenmesi ile virüse dayanıklı bitkilerin elde edilebileceği vurgulanmıştır (51, 52).

Yarmolinsky ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada; sülfat asimilasyonunun asıl enzimi olan sülfat redüktaz (SİR) enziminin ekspresyonunun RNA interferans ile engellenmesinin domates bitkisinde (*Lycopersicon esculentum*) yapraklardaerken

yaşlanmaya sebep olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada SİR Ri mutantlarda (yapraklarında görsel klorofil degradasyonu olan) hidrojen peroksid ve lipid peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehit akümülyasyonunun olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda SİR enziminin biyosentetik rolünün yanında erken yaşlanmanın önlenmesinde görev aldığı belirlenmiştir (53).

Shweta ve Jawaid'in 2014 yılı yayınında; pamukbitkisinde kıvrık yaprak fenotipine neden olan Allahabad virusü (CLCUAV) geninin transkriptleri olan AC1 ve AC4 viral replikasyon ve gen susturma mekanizmasında etkili olduğu belirlenmiştir (54). Chunhua ve ark. 2014; araştırmasında ise MYB transkripsiyon faktörlerinin bitki gelişimi, metabolizması ve stres cevaplarında rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışmada pirinç bitkisinde R2R3-MYB transkripsiyon faktörünü kodlayan OsMYB103L geninin fonksiyonu araştırılmıştır. OsMYB103L geni çekirdekte lokalize olur ve trans-aktivasyon kapasitesine sahiptir. Çalışma sonucunda bu genin over-ekspresyonunun pirinçte kıvrık yaprak fenotipine neden olduğu görülmüştür. Çalışmanın devamında selüloz sentez genlerinin de (CESAs) ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. OsMYB103L geninin RNAi teknolojisi ile susturulması CESAs geninin ekspresyonunun azaldığı, bitkide selüloz içeriğinin ve yapraktaki kıvrılmanın azaldığı görülmüştür (55).

Kiirika ve ark. 2014; *Medicago truncatula* bitkisinde GTPase MtROP9 geninin susturulması ile patojenik (*Aphanomyces euteiches*) ve simbiyotik mikroorganizmalarla (*Glomus intraradices*, *Sinorhizobium meliloti*) enfekte olmuş transgenik

köklerde (MtROP9i), ROS- ilişkili enzimlerinin baskılandığı ve ROS ürünlerinin azaldığı görülmüştür. Bu çalışmada aynı koşullar altındaki bitkilerde zamana bağlı proteom yanıtları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda indüklenen proteinlerin analizleri yapıldığında, ROS üretim ve temizleme mekanizmasının kökler tarafından kontrol edildiği görülürken, MtROP9i alternatif koruma mekanizmalarının olduğu belirlenmiştir (56). Wan ve ark. 2011; kuraklık stresine dayanıklı *Physcomitrella patensis* üzerinde yaptıkları çalışmada kuraklık stresi ile ilişkili 16 miRNA (DsAmR) belirlemişler, miR902a-5p ve miR414'nin kuraklık stresine karşı direnç oluşturma önemli olduğunu bildirmişlerdir (57).

SONUÇ

Sonuç olarak; RNA interferans (RNAi), miRNA ve siRNA'ların keşfi bilim dünyasını gen ifadesi, düzenlenme ve RNA işlevselliği alanlarında araştırmalara yöneltmiştir. RNA interferans (RNAi) mekanizması sadece işlevini bilmediğimiz genlerin fonksiyonlarını öğrenme konusunda değil, stres faktörlerine karşı dayanıklı transgenik bitki elde edilmesinden, patojenlerin neden olduğu hastalıklara karşı savunma mekanizmalarının geliştirilmesi vb. birçok alanda önemli katkılar sağlamıştır. Gelecekte, teknolojik araçların geliştirilmesiyle, farklı bitkilerde ve farklı koşullar altındaki post-transkripsiyonel düzenleme mekanizmalarının daha ayrıntılı bir şekilde anlaşılması mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* result in supression of homologous revesible co-supression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 1990; 2: 279-89.
2. Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. Chalgone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs.complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol*, 1996; 32(5): 957-73.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998; 391 (6669): 806-11.
4. DaneholtB. Advanced Information: RNA interference. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine*. Archived from the original. Retrieved, 2007.
5. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000; 101: 25-33.
6. Allshire R. RNAi and heterochromatin-a hushed-up affair. *Science*, 2002; 297: 1818-9.
7. Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanism and regulations. *Genes Dev*, 2006; 20: 759-71.
8. Zhao T. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes Dev*, 2007; 21(94): 1190-203.
9. Sunkar R. Zhu JK. Micro RNAs and Short-interfering RNAs in Plants. *J Integr Plant Biol*, 2007; 49: 817-26.
10. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009; 136: 642-55.
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116: 281-97.
12. Kim VN. Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells*, 2005; 19: 1-15.
13. Sunkar R, Zhu JK. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2004; 16: 2001-19.
14. Kim VN. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009; 10: 126-39.
15. Watanabe T, Totoki Y, Sasaki H, Minami N, Imai H. Analysis of small RNA profiles during development. *Methods Enzymol*, 2007; 427: 155-69.
16. Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE. ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, 2003; 31; 299(5607): 716-9.
17. Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One*, 2007; 19; 2(12): e1326.
18. Ashley J, Ian J. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Biol Chem*, 2009; 284(27): 17897-901.
19. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 2002; 297(5589): 2056-60.
20. Khvora A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 2003; 115(2): 209-16.
21. Saydam F, Degirmenci İ, Güneş HV. Mikro RNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal* 2011; 38(1): 113-20.
22. Sun W, Li YSJ, Huang HD, Shyy JYJ, Chien S. MicroRNA: A master Regulator of Cellular Process fro Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010; 12: 1-27.
23. Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanism for atiny RNA. 2005; 11812: 1753-61.
24. Nowotny M, Yang W. Structural and functional modules in RNA interference. *Curr Opin Struct Biol*, 2009; 19(3): 286-93.
25. William L, David S, Julian TR. Development and testing of the OPLS all atom force field for conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc*, 1996; 118(45): 11225-36.
26. Park W, Li J, Song R, Messing J, Chen X. Carpel factory, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 2002; 12(17): 1484-95.
27. Aday A. Computational prediction of miRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res*, 2005; 15: 78-91.

28. Li X, Zhang YZ. Computational detection of microRNAs targeting transcription factor genes in *Arabidopsis thaliana*. *Comput Biol Chem*, 2005; 29: 360-67.
29. Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell*, 2005; 17(5): 1397-411.
30. Billoud B, De Paepe R, Baulcombe D, Boccard M. Identification of new small non-coding RNAs from tobacco and *Arabidopsis*. *Biochimie*, 2005; 87(9-10): 905-10.
31. Dezulian T. Conservation and divergence of microRNA families in plants. *Genome Biol*, 2005; 6: 13-38.
32. Bedell JA, Budiman MA, Nunberg A, Citek RW, Robbins D, Jones J, et al. Sorghum genome sequencing by methylation filtration. *PLoS Biol*, 2005; 3(1): e13.
33. Lu S, Sun YS, Shi R, Clark C, Li L, Chiang VL. As in *Populus trichocarpa* are absent from *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005; 17: 2186-203.
34. Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa*. *Science*, 2006; 313: 1596-604.
35. Qiu CX, Xie FL, Zhu YY, Guo K, Huang SQ, Nie L, et al. Computational identification of microRNAs and their targets in *Gossypium hirsutum* expressed sequence tags. *Gene*, 2007; 395: 49-61.
36. Xie FL, Huang SQ, Guo K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *Febs Lett*, 2007; 581: 1464-74.
37. Zhao Y, Srivastava D. A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*, 2007; 32(4): 189-97.
38. Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, et al. A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *Plos one*, 2007; 12: 1326-44.
39. Arazi T, Talmor-Neiman M, Stav R, Riese M, Huijser P, Baulcombe DC. Cloning and characterization of micro RNAs from moss. *Plant J*, 2005; 43: 837-48.
40. Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. New York, London: Academic Press, 1972: 697.
41. Lichtenhaler HK. Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *J Plant Physiol*, 1996; 148: 4-14.
42. Cushman JC, Bohnert HJ. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol*, 2000; 3: 117-24.
43. Vinocur B, Altman A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr Opin Biotechnol*, 2005; 16: 123-32.
44. Chinnusamy V, Zhu JK. Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2009; 12: 1-7.
45. Felippes De FF, Schneeberger K, Dezulian T, Huson DH, Weigel D. Evolution of *Arabidopsis thaliana* microRNAs from random sequences. *RNA New York*, 2008; 14(12): 2455-9.
46. Piriyaongsa J, Jordan IK. Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. *RNA*, 2008; 14: 814-21.
47. Borchert GM, Holton NW, Williams JD, Hernan WL, Bishop IP, Dembosky JA, et al. Comprehensive analysis of microRNA genomic loci identifies pervasive repetitive element origins. *Mobile Genetic Elements*, 2011; 1(1): 8-17.
48. Lindbo JA, Silva Roales L, Proebsting WM, Dougherty WG. Introduction of highly specific antiviral state in transgenic plants: Implication for regulation gene expression and virus resistance. *Plant Cell*, 1993; 5: 1749-59.
49. Angell SM, Baulcombe DC. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *Embo J*, 1997; 16(12): 3675-84.
50. Gan D, Ding F, Zhuang D, Jiang H, Jiang T, Zhu S, et al. Application of RNA interference methodology to investigate and develop SCMV resistance in maize. *J Genet*, 2014; 93(2): 305-11.
51. Zhang ZY, Yang L, Zhou SF, Wang HG, Li WC, Fu FL. Improvement of resistance to maize dwarf mosaic virus mediated by transgenic RNA interference. *J Biotechnol*, 2011; 153(3-4): 181-7.

52. Zha WJ, Peng XX, Chen RZ, Du B, Zhu LL, He GC. Knockdown of midgut genes by dsRNA-transgenic plantmediated RNA interference in the hemipteran insect *Nilaparvata lugens*. *PLoS One*, 2011; 6(5): 20504.
53. Yarmolinsky D, Brychkova G, Kurmanbayeva A, Bekturova A, Ventura Y, Khozin-Goldberg I, et al. Impairment in Sulfite Reductase Leads to Early Leaf Senescence in Tomato Plants. *American Society of Plant Biologists*, 2014; 165: 1505-20.
54. Shweta M, JA Khan. In silico prediction of cotton (*Gossypium hirsutum*) encoded microRNAs targets in the genome of Cotton leaf curl Allahabad virus. *Bioinformatics*, 2014; 10(5): 251-5.
55. Chunhua Y, Dayong L, Xue L, Chengjun J, Lili H, Xianfeng Z, et al. OsMYB103L, an R2R3-MYB transcription factor, influences leaf rolling and mechanical strength in rice (*Oryza sativa*L.). *BMC Plant Biol*, 2014; 14: 158.
56. Kiriika LM, Bergmann HF, Schikowsky C, Wimmer D, Korte J, Schmitz U, et al. Silencing of the Rac1 GTPase MtROP9 in *Medicago truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection. *Plant Physiol*, 2012; 159(1): 501-16.
57. Wan P, Wu J, Zhou Y, Xiao J, Feng J, Zhao W, et al. Computational Analysis of Drought Stress-Associated miRNAs and miRNA Co-Regulation Network in *Physcomitrella patens*. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2011; 9(1-2): 37-44.

Molecular techniques for clinical diagnostic mycology

Mikolojik klinik tanıda moleküler teknikler

Nuri KİRAZ¹

ABSTRACT

Diagnosing fungal infections remains a problem, particularly in the immunocompromised patient. The clinical manifestations of invasive fungal infections are usually not specific and can be produced by other organisms and colonization is difficult to distinguish from invasive disease. Existing diagnostic tools often lack sensitivity. Thus, the combination of various diagnostic tools is mandatory to allow earlier diagnosis of systemic fungal infections. Microscopy, culture based methods, antigen detection, and molecular techniques may help to facilitate and accelerate the diagnosis. Molecular methods are being developed for the detection and identification of fungi present in clinical samples at a very fast rate, whether it is done by nucleic acid amplification technology or by specific probes or nucleic acid sequencing. However, no comparative studies have been done to determine which are optimal and no standards for testing have been developed to date. Therefore, extensive validation and standardization is needed, before molecular assays can be used in a routine laboratory.

Key Words: Molecular diagnosis of fungal infections, fungus identification, molecular typing

ÖZET

Mantar hastalıklarının tanımı, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda bir sorun olmaya devam etmektedir. İnvaziv mantar enfeksiyonlarının klinik yönleri genellikle özgül değildir, başka mikroorganizmalar tarafından da oluşturulabilir ve kolonizasyonu invaziv hastalıktan ayırt etmek güçtür. Mevcut tanım yöntemleri ekseri duyarlılıktan yoksundur. Böylece, sistemik mantar enfeksiyonlarının erken tanımı için çeşitli tanım yöntemlerinin birlikte kullanılması gerekmektedir. Mikroskop incelemesi, kültüre dayalı yöntemler, antijen aranması ve moleküler teknikler tanımı kolaylaştırabilir ve hızlandırabilir. Klinik örnekte bulunan mantarın belirlenmesi ve tanımlanması için nükleik asit amplifikasyon teknolojisi, özgül problemler ve nükleik asit sekanslama moleküler teknikleri çok hızla gelişmektedir. Ancak hangisinin en uygun olduğunu belirlemek için henüz karşılaştırmalı çalışmalar bulunmamaktadır ve bugüne kadar testlerin standartlaştırılması geliştirilememiştir. Dolayısıyla, moleküler testlerin rutin laboratuvarlarda kullanılabilmesi için önce geçerli kılınmalarına ve standartlaştırılmalarına gereksinim bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mantar enfeksiyonları moleküler tanı, mantarın tanımı, mantarların moleküler tiplendirilmesi

¹ Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Dept of Medical Microbiology, İSTANBUL, TURKEY



İletişim / Corresponding Author : Nuri KİRAZ

Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Dept of Medical Microbiology, İSTANBUL, TURKEY

Tel : +90 532 404 6999

E-posta / E-mail : nurikiraz@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 30.04.2015

Kabul Tarihi / Accepted : 25.06.2015

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.99705

Kiraz N. Molecular techniques for clinical diagnostic mycology. Türk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(3): 263-72.

INTRODUCTION

In the clinical mycology laboratory, identification of fungi to species level is important to determine the etiology of disease, to detect novel agents of disease, to predict intrinsic resistance to antifungal agents, and to detect clusters of nosocomial infection among hospitalized patients. This information can be critically important in the management of fungal infection in the high risk patient. It is also important to recognize whether a fungal isolate recovered from a clinical sample do represent significant disease and the clinical relevance of that isolate.

Fungal infections which have emerged in recent years in the immunocompromised hosts, and different antifungal susceptibilities have emphasized the importance of early and accurate diagnosis (1). Clinical manifestations are seldom specific, a laboratory identification of the etiological fungus is, therefore, essential in establishing a definitive diagnosis.

In clinical mycology laboratory, identification of fungi to species level is important to determine the etiology of the disease, to detect novel agents of disease, to predict intrinsic resistance to antifungal agents, and to detect clusters of nosocomial infection among hospitalized patients. This information can be critically important in the management of fungal infection in the high-risk patient. It is also important to recognize whether a fungal isolate recovered from a clinical sample do represent significant disease and the clinical relevance of that isolate.

The recovery of etiologic agents from clinical specimens is still considered to be the “gold standart”. Methods used for identification of the fungi are a mixture of traditional and newer commercially available systems, e.g. yeast identification kits are commonly used for this subject. Standard protocols to the laboratory diagnosis of invasive fungal infections depend upon (a) direct microscopic inspection of freshly obtained patient specimens for the presence of organisms, (b) recovery of fungi

from cultures of blood, body fluids, tissues or other sites, and (c) histological identification of organisms morphologically consistent with certain species of fungi (2). Identification of emerging fungal pathogens by conventional methods is considerably difficult, time consuming and requires highly experienced laboratory staff for visual recognition of morphology. In some circumstances, whether the isolate displays atypical morphology, fails to sporulation, phenotypic results are nonspecific or especially confusing (3). The polymerase chain reaction (PCR) is a fairly simple but powerful technique for molecular investigations of fungal phylogeny. Additionally, recent advances in molecular phylogenetic taxonomy have revealed cryptic species within morphologically indistinguishable isolates. Most serologic tests designed to detect specific serum antibodies are ineffective, because many patients who are at risk for fungal disease are not capable of mounting a specific antibody response to infection. Antigen detection for certain fungal agents can be useful for some patients suffering from invasive fungal infections but identification at species level is not achieved (4).

Deoxyribonucleic acid (DNA) and ribonucleic acid (RNA), or proteins of an infection agent in clinical sample can be used to help identify the agent. Molecular techniques are being developed for the analysis of infectious fungal agents either present in clinical samples or grown on cultures. Molecular techniques such as restriction fragment length polymorphism (RFLP), electrophoretic karyotyping, multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) are also useful biotyping tools to increase the knowledge of pathogenic fungi and develop prevention strategies (4-7).

1. DIRECT DETECTION OF THE NUCLEIC ACID OF FUNGI IN CLINICAL SPECIMENS

The use of molecular technologies in the detection and identification of fungi is still really in

its infancy compared with other areas of microbiology such as virology and bacteriology (8) but molecular diagnostics may offer mycologists many advantages such as sensitivity, specificity, simplicity and fastness. During traditional culture process, the disease may have progressed to be a point where therapy may be ineffective; molecular detection may allow for monitoring patients on a periodic basis for the presence of circulating nucleic acid of the infecting organism. Being able to start therapy at a much earlier time during the clinical course may significantly affect the survival rate of the patient with a life-threatening fungal infection (5, 6).

1.1. In situ hybridization using specific nucleic acid probes

One of the simplest approaches used has been in situ hybridization using specific nucleic acid probes for the identification of organisms in patient specimens. This method lacks amplification and is less sensitive than other assays but is useful for identifying fungi that can be seen in tissue and other clinical specimens (5). DNA probes can be used like antibodies as sensitive and specific tools to detect, locate, and quantify specific nucleic acid sequences in clinical specimens.

DNA probes are chemically synthesized or obtained by cloning specific genomic fragments. After chemical or heat treatments melt (separate) the DNA strands in the sample, the DNA probe is added and allowed to hybridize (bind) with the identical or nearly identical sequence in the sample. The stringency (the requirement for an exact sequence match) of the interaction can be varied so that related sequences can be detected or different strains (mutants) can be distinguished. The DNA probes are labeled with radioactive or chemically modified nucleotides so that they can be detected and quantitated (6).

The DNA probes can detect specific genetic sequences, in fixed, permeabilized tissue biopsy specimens by in situ hybridization. When fluorescent

detection is used it is called Fluorescent in situ hybridization (FISH) (8).

Assays for *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium* and many other fungi are helpful when a morphological identification can not be made (9-14). Identification of fungi in tissue sections can be difficult. In particular, species of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Pseudallescheria* all appear as septate, branched hyphae. While there was no ability to distinguish between the three groups of organisms by morphologic features, in situ hybridization may assist in rapidly distinguishing these organisms. Oligonucleotide DNA probes were directed against the 5S, 18S or 28S rRNA sequences of three groups of fungi with a high degree of specificity for each (8).

1.2 Amplification assays using the polymerase chain reaction (PCR)

The polymerase chain reaction (PCR) amplifies single copies of fungal DNA millions of times over and allows for the detection of small amounts of target DNA in clinical specimens (15). In this technique, a sample is incubated with two short DNA oligomers, termed primers, that are complementary to the ends of a known genetic sequence within the total DNA, a heat-stable DNA polymerase (Taq or other polymerase obtained from thermophilic bacteria), nucleotides and buffers. The oligomers hybridize to the appropriate sequence of DNA, and act as primers for the polymerase, which copies that segment of the DNA (15). The sample is then heated to 95°C to denature the DNA (separating the strands of the double helix) and cooled to anywhere from 42-75°C. This allows the primers to bind (anneal) to their complementary sequence in the template DNA. The reaction is then heated to 72 °C, the optimal temperature for DNA polymerase to act. DNA polymerase extends the primers, adding nucleotides onto the primer in a sequential manner, using the target DNA as a template. These steps are repeated many (20 to 40) times to amplify the original DNA sequence in

an exponential manner. A target sequence can be amplified 1,000,000-fold in a few hours using this method (6).

Amplification assays using the PCR or similar methods allow for the detection of small amounts of target DNA in clinical specimens. Specific primers with or without specific probes have been used with or without specific probes have been used with some success. A few reviews (2, 3, 16-19) and several papers (20-23) summarize specific targets used and detection methods. Assays have been developed to detect DNA of *Candida* (24-26), *Aspergillus* (27, 28), *Fusarium* (29), *Cryptococcus* (30), *Histoplasma* (31), *Blastomyces* (32), *Coccidioides* (33), *Mucormycetes* (34), *Paracoccidioides* (35), *Penicillium marneffeii* (36) and dermatophytes (37).

Quantitative real-time PCR can be used to quantitate the amount of DNA or RNA after it is converted to DNA by reverse transcriptase (6). Simply put, the more DNA in the sample, the faster new DNA is made in a PCR reaction, and the reaction kinetics are proportional to the amount of DNA (6). The proportion of double stranded DNA is measured by the increase in fluorescence of a molecule bound to the amplified double-strand DNA molecule or by other means (6). Results are available within one hour of testing and sensitivity is exquisite. This technology was used to develop assays for *Aspergillus*, *Candida*, and the zygomycetes (26). Real-time PCR was also used for the identification of culture isolates of *Histoplasma capsulatum* (38). The Light Cycler may also be used to identify organisms to the species level using specific primers and probes (5).

3. MOLECULAR METHODS AVAILABLE FOR IDENTIFICATION OF ISOLATED FUNGI

Recent improvements in technology and the availability of whole genome sequences for many fungi have made DNA sequence-based methods useful for both research and clinical microbiology application (3). Today it is possible to obtain a

sequence-based identification of an unknown fungus grown in culture. The choice of locus depends on the type of fungi studied and the level of identification required. In general, the conserved 18S or 28S regions are appropriate for analyses at the genus level and above, while the ITS regions and the variable D1/D2 domains are used for analyses at the clade or species level and below (38). Although the ITS region and the D1/D2 domains remain the most commonly sequenced fungal loci, they suffer from several disadvantages, including failure to distinguish closely related species due to few variable nucleotide sites. Alternate markers that have been evaluated as possible "universal loci" for use with a wide range of fungi include translation elongation factor 1 α (EF-1), β -tubulin, and RPB2, the gene that codes second largest RNA polymerase subunit (3).

After the target locus is decided and a sequencing product is obtained, the next step is to compare DNA sequence of the unknown with DNA sequences in a database such as BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The species identification of the unknown isolate can be determined by comparison to the similarity scores of the database sequences. However, there can be problems in interpreting the results when the percentage similarity is lower (3). GenBank is the US National Institutes of Health (NIH) genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences. The GenBank database is designed to provide and encourage access within the scientific community to the most up to date and comprehensive DNA sequence information.

4. MOLECULAR TYPING METHODS

In the past, phenotypes of fungi were determined by the morphology of the colonies when grown on specific media, by biochemical tests, by serology, by killer toxin susceptibility and by resistotyping. However, these systems did not show enough reproducibility, were often excessively cumbersome, and above all, had limited discriminatory power.

Furthermore, some fungi, such as *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *Cryptococcus neoformans* can switch phenotype, thus rendering the phenotyping techniques unable to answer these questions (7). The use of molecular methods is important to investigate the epidemiology and environmental sources of fungi that infect immunocompromised patients and, in some instances, immunocompetent patients (5, 40).

The development of DNA-fingerprinting techniques has enabled us to compare the genomes of the strains and selected areas of the genome, named genetic markers (7). Several criteria have been proposed for assessing the discriminatory power of a fingerprinting method in determining genetic relatedness (7). Epidemiologic typing can determine whether or not organisms share the same DNA profile and this can be related to environmental isolates to determine the point source. Most of the studies have been related to isolates of *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Fusarium*. The use of molecular tools has allowed for the reduction of hospital-acquired infections and their spread (5).

Techniques based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) with or without hybridization probes (Southern), PCR-based techniques, electrophoretic karyotyping (EK) and multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) and the newer ones that are being developed for the fingerprinting of fungal strains (7).

4.1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) or restriction enzyme analysis (REA)

Purified DNA is restricted by selected endonucleases, and the yielded fragments are separated in an agarose gel (7). This generates a banding pattern based on different fragment lengths determined by the restriction sites identified by the particular endonuclease used. Variations among strains can occur as a result of mutations in restriction site sequences. This technique had the advantage of being rapid, easy and inexpensive (7).

4.2. RFLP with hybridization

The fragments generated by RFLP, can be transferred to a membrane and hybridized by Southern blot with a probe that can recognize one or more fragments of the restricted DNA (7). In this manner, only certain fragments of the RFLP are selected for visualisation, thus ignoring the rDNA and the mitochondrial DNA, and increasing the resolution. The advantage of this method is that, if a probe is carefully selected, it can have high discriminatory power (7).

4.3. PCR-based techniques

These methods are similar to RFLP, because they evaluate DNA sequence variation in short regions, but instead of analyzing restriction endonuclease recognition sequences, they focus on PCR priming regions. This can prevent primer annealing and PCR amplification and can detect insertions and deletions in genome. The main advantage of this technique is that it is rapid, easy and relatively inexpensive (7).

PCR-based techniques have been broadly used to compare isolates of several fungal species, such as *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* (41), *Aspergillus fumigatus* (42), *Cryptococcus neoformans* (43) and *Fusarium solani* (44).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) uses a random single primer of approximately ten bases. It is easily designed, technically simple and often detects variation among isolates that are invariant with RFLP analysis, with or without Southern blot hybridization (7).

Sequence-specific DNA polymorphism (SSDP) uses specific primers and PCR at higher stringency, thus avoiding the drawback of the lack of reproducibility of the RAPD method (45).

Microsatellites are tandemly repeated stretches of two to six nucleotides that occur between coding regions of eukaryotic genomes, including fungi (42).

Microsatellite length polymorphism (MLP) uses specific primers for these sequences in order to amplify the microsatellite locus by PCR (46).

4.4. Electrophoretic karyotyping (EK)

In this technique, intact DNA molecules migrate through an agarose gel matrix under the influence of pulsed fields, which permits easy separation of DNA molecules of several megabases. Chromosome-length polymorphism is evaluated by EK analysis, which uses electric fields of alternating orientation to move intact chromosomes through an agarose gel matrix. The analysis of chromosomal binding patterns, known as electrophoretic karyotypes, and the detection of karyotypic variations within the species. EK has been extensively used to fingerprint *C. albicans* and other *Candida* species. It has a moderate discriminatory power, however, shows good reproducibility (7).

4.5. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)

MLEE evaluates the polymorphism of isoenzymes or alloenzymes of the isolates. Proteins from cell extracts are separated by electrophoresis under native conditions, and the enzymes are visualized by specific enzyme-staining procedures (7). The main advantage of this method is its high discriminatory power when a sufficient number of enzymes is evaluated, and the very low probability of homoplasy in clonal organisms (7).

4.6. Identification of single-nucleotide polymorphisms (SNPs)

SNPs are single-base variations at a unique physical location. A variety of techniques is available for SNP identification, such as confirmation-based polymorphism scanning single-strand confirmation polymorphism analysis (SSCP) (7).

4.7. DNA microarray genotyping

The DNA microarray is a hybridization-based genotyping technique that offers simultaneous

analysis of many polymorphisms. High-density microarray (or DNA chips) are prepared by attaching hundreds of thousands of oligonucleotids to a solid silicon surface in an ordered array. Microarrays produce a very large amount of sensitive and accurate data, and can analyze a large number of polymorphisms at a time. However, at present, there are difficulties in the management and analysis of the high amount of data generated (7, 47).

4.8. DNA sequencing

DNA sequencing is the most accurate way to compare two strains by comparing the sequences of their genomes. This method displayed a high discriminatory power, and the ability to discriminate heterozygotes (46).

Another fingerprinting technique that uses sequencing of certain areas of the genome is multilocus sequence typing (MLST) which is similar in concept to MLEE, but it uses nucleotide sequence determination to identify the alleles of housekeeping genes. It is much faster and easier to perform since it is based on a PCR technique and shows very good reproducibility (48, 49).

5. CONCLUSION

Considering the large number of fungi in the environment that are capable of causing human disease, it may be difficult to believe that molecular methods will replace conventional methods anytime soon. However, a limited number of fungi may be identified to genus and species using PCR and specific probes. Yeasts in blood cultures have been identified and most were species of *Candida*, *Aspergillus*, *zygomycetes*, *dermatophytes*, and several filamentous fungi may be identified using amplification and probes. Nucleic acid sequencing has been use with great success for the identification of fungi in culture (5).

Overall, molecular methods have and will continue to have a major impact on the diagnosis

and appropriate treatment of fungal infection. Analytical parameters of these methods need to be standardized to optimize sensitivity and specificity and comparative studies need to be performed to determine which are best to use in the laboratory. Ideally tests should be as simple as possible to perform so that most clinical laboratories can use them. The most important element, clinical correlation, must be established for methods. If these criteria are met, most of the newly developed molecular-based tests

will be available to all of the patients with fungal infection (5). They will be especially useful for non-culturable, slow growing, pleomorphic opportunistic fungi. The time required to achieve the molecular skills is minimal compared to the time required to be trained as a classical mycologist. However, regarding the vast number of fungi exists in the environment which may infect particularly immunocompromized patients, a strong partnership between classical mycology and molecular biology is needed.

REFERENCES

1. Khot PD, Ko DL, Fredricks DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR analysis. *Appl Environ Microbiol*, 2009; 75(6): 1559-65.
2. Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15(3): 465-84.
3. Balajee SA, Sigler L, Brandt ME. DNA and the classical way: identification of medically important molds in the 21st century. *Med Mycol*, 2007; 45(6): 475-90.
4. Stevens DA. Diagnosis of fungal infections: current status. *J Antimicrob Chemother*, 2002; 49 (Suppl S1): 11-9.
5. Roberts GD, Goodman NL. Laboratory diagnosis. In: Merz WG, Hay RJ. (Eds) *Medical Mycology*, ASM Press, London, 10th ed, 2005, pp. 82-96.
6. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Molecular diagnosis. In: *Medical Microbiology*, Elsevier, Philadelphia, 7th ed, 2013, pp. 25-8.
7. Gil-Lamaignere C, Roillides E, Hacker J, Müller FMC. Molecular typing for fungi- a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect*, 2003; 9(3): 172-85.
8. Stone NR, Gorton RL, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. Evaluation of PNA-FISH yeast traffic light for rapid identification of yeast directly from positive blood cultures and assessment of clinical impact. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(4): 1301-2.
9. Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV. In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. *Diagn Mol Pathol*, 2001; 10(1): 15-23.

10. Hayden RT, Qian X, Procop GV, Roberts GD, Lloyd RV. In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. *Diagn Mol Pathol*, 2002; 11(2): 119-26.
11. Hayden RT, Isolato PA, Parret T, Walk DM, Qian X, Procop GV, et al. In situ hybridization for the detection of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Pseudallescheria* species in tissue section. *Diagn Mol Pathol*, 2003; 12(1): 21-6.
12. Shinozaki M, Okubo Y, Sasai D, et al. Identification of *Fusarium* species in formalin-fixed and paraffin-embedded sections by in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *J Clin Microbiol*, 2011; 49(3): 808-13.
13. Montone KT. Differentiation *Fusarium* from *Aspergillus* species by colorimetric in situ hybridization in formaline-fixed, paraffin-embedded tissue sections using dual fluorogenic-labeled LNA probes. *Am J Clin Pathol*, 2009; 132(6): 866-70.
14. Perez-Jaffe LA, Lanza DC, Loevner LA, Kennedy DV, Montone KT. In situ hybridization for *Aspergillus* and *Penicillium* in allergic fungal sinusitis: a rapid means of speciating fungal pathogens in tissues. *Laryngoscope*, 1997; 107(2): 233-40.
15. Chen SCA, Catriona LH, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. *Med Mycol*, 2002; 40(4): 333-57.
16. Walther G, Pawlowska J, Alastruey-Izquierdo A, et al. DNA barcoding in *Mucorales*: an inventory in biodiversity. *Persoonia*, 2013; 30: 11-47.
17. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Gen*, 2007; 7(1): 3-5.
18. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*, 2010; 28(2): 190-6.
19. Kline BC, Sandhu GS, Roberts GD. Mycology with molecular probes. *Rev Iberoam Mycol*, 1997; 14(1): 4-5.
20. Campa D, Tavanti A, Gemignani F, et al. DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi responsible for invasive and superficial mycoses. *J Clin Microbiol*, 2008; 46(3): 909-15.
21. Miller MB, Tang Yi-Wei. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 2009; 22(4): 611-33.
22. Rickerts V, Khot PD, Myerson D, Ko DL, Lambrecht E, Fredricks DN. Comparison of quantitative real time PCR with sequencing and ribosomal RNA-FISH for the identification of fungi in formalin fixed, paraffin embedded tissue specimens. *BMC Infect Dis*, 2011; 11: 202-13.
23. Huang A, Li J-W, Shen Z-Q, Wang X-W, Jin M. High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol*, 2006; 44(9): 3299-305.
24. Hays C, Duhamel C, Cattoir V, Bonhomme J. Rapid and accurate identification of species belonging to the *Candida parapsilosis* complex by real-time PCR and melting curve analysis. *J Med Microbiol*, 2011; 60(4): 477-80.
25. Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, et al. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol*, 2010; 59(4): 414-20.
26. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(2): 86-90.
27. Lass-Flörl C, Rath P, Niederwieser D, et al. *Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants. *J Hosp Infect*, 2000; 46(1): 31-5.

28. Ferns RB, Fletcher H, Bradley S, Mackinnon S, Hunt C, Tedder RS. The prospective evaluation of a nested polymerase chain reaction assay for the early detection of *Aspergillus* infection in patients with leukemia or undergoing allograft treatment. *Br J Haematol*, 2002; 119(3): 720-5.
29. Hue FX, Huerre M, Rouffault MA, de Bievre C. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(8): 2434-8.
30. Hendolin PH, Paulin L, Koilula-Kahköla P, et al. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(11): 4186-92.
31. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(5): 1644-7.
32. Bialek R, Cirera AC, Herrmann T, Aepinus C, Schearn-Bocler VI, Legendre AM. Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin embedded canine tissue. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(1): 205-8.
33. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts, G.D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol*, 1995; 33(11): 2913-9.
34. Bernal-Martinez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Development of a single tube multiplex realtime PCR to detect the most clinically relevant *Mucormycetes* species. *Clin Microbiol Infect*, 2013; 19(1): 1-7.
35. Gomes GM, Cisalpino CS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(9): 3478-80.
36. Vanittanakom N, Vanittanakom P, et al. Rapid identification of *Penicillium marneffeii* by PCR based detection of specific sequences on the rRNA gene. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(5): 1739-42.
37. Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol*, 2004; 53(12): 1207-14.
38. Martagon-Villamil J, Sherestha N, Sholtis M, et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(3): 1295-8.
39. Kurtzman CP. Recognition of yeast species from gene sequence comparisons. *Open Appl Inform J*, 2011; 5(Suppl1-M4): 20-9.
40. Kiraz N, Akgün Y. Typing methods for *Candida albicans* strains. *Turkish J Infect*, 2000; 2: 297-306.
41. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(2): 417-21.
42. Anderson MJ, Gull K, Denning DW. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 1996; 34(1): 87-93.
43. Cogliati M, Allaria M, Tortorano AM, Viviani, MA. Genotyping *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* with specific primers designed from PCR-fingerprinting bands sequenced using a modified PCR-based strategy. *Med Mycol*, 2000; 38(2): 97-103.
44. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis*, 2001; 33(11): 1871-8.
45. Mondon P, Brenier MP, Symoens F, et al. Molecular typing of *Aspergillus fumigatus* strains by sequence-specific DNA primer (SSDP) analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1997; 17(2): 95-107.

46. Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J Clin Microbiol*, 2001; 39(11): 4076-81.
47. Kurella M, Hsiao LL, Yoshida T, et al. DNA microarray analysis of complex biologic processes. *J Am Soc Nephrol*, 2001; 12(5): 1072-8.
48. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(6): 3140-5.
49. Feavers IM, Gray SJ, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing and antigen gene sequencing in the investigations of a meningococcal disease outbreak. *J Clin Microbiol*, 1999; 37(12): 3883-7.

TELİF HAKKI DEVRİ / COPYRIGHT RELEASE



TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

...../...../20...

Makale Türü/Article Type:

(...) Araştırma/Research (..) Derleme/Review (..) Olgu Sunumu/Case Report (..) Editöre Mektup/Letter to Editor

Makale Başlığı/Article Entitled :

Sayın Editör,

Yayınlanması dileğiyle Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne gönderdiğimiz makalenin yazarları olarak;

1. Derginizde yayımlanmak üzere yollamış olduğumuz makalenin orjinal olduğunu; bilimsel ve etik sorumluluğunun bize ait olduğunu,
2. Makalenin; derginizdeki değerlendirme sürecinde başka bir yayın organına yayımlanmak üzere gönderilmediğini ve gönderilmeyeceğini,
3. Makalenin; kişilik ve telif haklarına aykırı kanun dışı maddeler içermediğini,
4. Yayın haklarının Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi'ne ait olduğunu kabul ve beyan ederiz.

Dear Editor,

Here, we affirm and warranty as the author(s) of this manuscript submitted to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology that;

1. The article I / We submitted to the Bulletin is original and responsibilities are belong to us ethically and scientifically,
2. The article is not currently being considered for publication by any other journal and will not be submitted for such review while under the evaluation of this bulletin,
3. The article contains no unlawful statements and does not contain any materials that violate any personal or proprietary rights,
4. The article publishing rights belong to Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology.

(...1) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...2) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...3) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...4) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

(...5) İmza/Signature :

Yazışma Adresi/Corresponding Address :

Tel/Phone : Faks/Fax : e-posta/e-mail :

Not / Note : 1. İletişim kurulacak yazarın yanına (X) işareti koyunuz / Please indicate the corresponding author with (X)

2. Formu aşağıdaki adrese faks/posta yolu ile gönderiniz veya elden teslim ediniz / Please send this form to the address below by faks or mail or deliver personally.

TÜRKİYE HALK SAĞLIĞI KURUMU / PUBLIC HEALTH INSTITUTION OF TURKEY

Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi / Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology

Sağlık Mah. Adnan Saygun Cad. No: 55 Refik Saydam Yerleşkesi 06100 Sıhhiye-ANKARA-TURKEY

Tel/Phone : +90 312 565 55 79

Faks/Fax : +90 312 565 54 55

e-posta/e-mail : turkhijyen@thsk.gov.tr

